

*** NOTICES ***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Field of an invention This invention relates to the amplification method of a specific nucleic acid sequence.

The background of an invention In order to detect the specific nucleic acid sequence which exists in a specimen, it is used with the diagnosing method with publicly known carrying out the probe of the specimen by the complementary sequence of nucleic acid. The combination with nucleic acid and complementary nucleic acid can judge effectively whether specific nucleic acid exists in a specimen specifically therefore highly. For the purpose, it is required to build the probe which the specific nucleic acid sequence which should be detected is known, and has a complementary nucleic acid sequence in this specific sequence.

The term which it "specific nucleic acid sequence" Comes to set to this application means the nucleic acid of the single chain or double chain which should be made to amplify. "Specimen" The becoming term means the mixture containing two or more nucleic acid. The becoming "sufficiently complementary" term means that two nucleic acid, i.e., a primer and a mold, can interact specifically, and DNA synthesis of a mold dependency is effectively performed with a primer dependency under given ionic strength conditions and temperature conditions.

It is more desirable to carry out the probe of the nucleic acid sequence itself more nearly rather than the protein produced by the nucleic acid sequence in some cases, since the nucleic acid probe is highly specific. For example, in the diagnosing method only based on protein detection, diagnosis reliable about existence of the infectivity particles of a hepatitis B virus cannot be drawn. This is because the noninfectious antigen particles the DNA genome carried out [particles] deletion exist by a significant level. In another example, various subtypes of the human papillomavirus detected in a precancerous or benign neck-of-uterus tumor can be identified, only when nucleic-acid-probe hybridization is used. Also from the microbiological investigation of the acquired immunodeficiency syndrome, it was checked that the assay based on existence of an acquired immunodeficiency syndrome specific nucleic acid sequence is the best diagnosing method.

the reason which has a limit in the practicality of the greatest difficulty and the existing probe art accompanying use of the existing nucleic-acid-probe art is on the problem of a copy number. For example, the single copy (single copy) of a specific gene usually exists in one a virus or a cell. This one copy can generate many copies of the gene production thing like RNA or protein. For this reason, since the specific sequence of the nucleic acid which should be detected may also have produced thousands of proteinic copies, the art which carries out the probe of the protein in a diagnosing method was often used.

In order to perform easily diagnosis of Legionella (Legionella) and the bacterial pathogen of a

certain kind like the mycoplasma (*Mycoplasma*) using a nucleic acid probe, The natural ribosomal RNA of a large number which reach 100,000 copies per cell has been used by the gene-probe (GenProbe) method. However, this strategy cannot be used for the noncellular pathogen like a virus. Especially in development of the AIDS virus detecting method using a nucleic acid probe, a copy number becomes a problem. It is because the provirus incorporated in this case may exist in less than one lymphocyte among 10,000 peripheral blood lymphocytes. Therefore, if the specific nucleic acid sequence expected to exist in a specimen can be amplified, the problem of a copy number is solved and probe assay can be used more easily.

In the normal living thing specimen which contains only a small number of cell, therefore includes only the a small number of copy of a specific gene, in order to solve the problem of a copy number, it is necessary to use an amplification method.

One amplification method is performing "sufficient growth" of a specimen, i.e., prepare conditions so that the useful living thing substance which exists in a specimen can reproduce automatically. The quantity of a nucleic acid sequence is made to increase to a detectable level by a duplicate. For example, in order to inspect the harmful bacteria *Salmonella* of a processed food, it is necessary to incubate a foodstuffs specimen how many days and to make the amount of nucleic acid increase in food industry. In a clinical specimen, in order to make the number of pathogens increase, it is necessary to proliferate a specimen over a remarkable period. U.S. Pat. No. 4,683,195 of Cetus Corporation as of July 28, 1987 and U.S. Pat. No. 4,683,202 of Cetus Corporation as of July 28, 1987 are indicating the amplification method of the target-nucleic-acid arrangement included in a specimen, respectively. It is the method of processing the specimen expected that the method indicated to U.S. Pat. No. 4,683,195 contains target-nucleic-acid arrangement by an oligonucleotide primer, compounding a primer extension production thing, and making target-nucleic-acid arrangement amplifying by using this production thing as a mold. In the preferred embodiment, the primer extension production product is separated from the mold using thermal denaturation. A method given in U.S. Pat. No. 4,683,202 is an amplification method of target-nucleic-acid arrangement with two different complementary strands. In this method, a chain is processed by a primer, an extension production thing is compounded, a primer extension production thing is separated from a mold, and then a primer extension production thing is used as a mold.

All, in an amplification method, a user needs to intervene in a manual target or a machinery target, and the two above-mentioned United States patents need to perform multi stage story operation. In the operation stage included in these patents, a user needs to heat a specimen, needs to cool, needs to add suitable oxygen, and, subsequently needs to repeat many stages. A temperature change deactivates an enzyme. Therefore, the user needs to repeat and supplement an amplification mixture with the aliquot of an enzyme suitable in the case of an amplification process. According to U.S. Pat. No. 4,683,195 and No. 4,683,202, further, in each cycle of an amplification method, the 2nd mold is compounded from the 1st mold, next the 2nd mold is used and the 1st mold is compounded. Thus, although this procedure is repeated, each cycle of the amplification method is based on composition of one production thing from one substrate. Improvement of the amplification method is needed irrespective of the amplification method indicated by conventional technology. An amplification method with little operation with little a user's intervention is preferred. It is advantageous that amplification is performed at a comparatively fixed room temperature so that the activity of the enzyme which participates in an amplification method may not be affected. It will be still more convenient if two or more production things are generable from one substrate for every cycle of an amplification method using one mold. Outline of an invention This invention requires the intervention and operation by a user for advantageous amplification methods fewer than the conventional amplification method.

Amplification is performed at a comparatively fixed room temperature. In each cycle of this method, the multiple copy of that production thing is produced from one substrate. The amplification method of this invention may be used in order to make the quantity of specific nucleic acid increase and for this to solve the problem of a copy number. Therefore, use of probe assay becomes easier. In order to raise the purity of a specific nucleic acid sequence, it is also possible to use the amplification method of this invention for the conventional cloning method, substituting for it.

According to one mode of this invention, the amplification method of a specific nucleic acid sequence is used. This method includes composition of single stranded RNA, a single stranded DNA, and duplex deoxyribonucleic acid. Single stranded RNA is the 1st mold for the 1st primer. A single stranded DNA is the 2nd mold for the 2nd primer. Duplex deoxyribonucleic acid is the 3rd mold for multiple copy composition of the 1st mold. It is complementary enough to the arrangement of a specific nucleic acid sequence in the arrangement of the 1st or 2nd primer, and the arrangement of the 1st or 2nd primer is fully homologous at the arrangement of a specific nucleic acid sequence. The end of 3' of the 1st primer is oriented towards the end of 3' of the 2nd primer on a complementary strand.

According to another mode of this invention, the amplification method of a specific nucleic acid sequence is used. This method includes the following stages.

- (a) Hybridize the 1st primer to the 1st mold. The 1st primer has a DNA sequence complementary enough in the RNA sequence of the 1st mold.
- (b) Carry out a covalent bond to the 1st primer, and compound the 1st complementary DNA to the RNA sequence of the 1st mold. The 1st DNA sequence and the 1st primer constitute the 2nd mold.
- (c) In order to make the hybridization of the 2nd primer perform, separate the 1st mold from the 2nd mold.
- (d) Hybridize the 2nd primer to the 2nd mold. The 2nd primer has a DNA sequence complementary enough in the DNA sequence of the 2nd mold. The 2nd primer has the antisense arrangement of the promotor for RNA polymerase, and the antisense arrangement of a transcription initiation site again.
- (e) Carry out a covalent bond to the 2nd primer, compound the 2nd DNA sequence complementary to the DNA sequence of the 2nd mold, carry out a covalent bond to the 2nd mold, and compound the 3rd complementary DNA sequence to the DNA sequence of the 2nd primer. The 2nd and 3rd DNA sequences and 2nd molds of the 2nd primer constitute the 3rd mold.
- (f) Compound the multiple copy of the RNA sequence of the 3rd mold to the 1st mold.

It is complementary enough to a specific nucleic acid sequence in the arrangement of the 1st or 2nd primer, and the arrangement of the 1st or 2nd primer is fully homologous at the arrangement of a specific nucleic acid sequence. 3' end of the 1st primer is oriented toward 3' end of the 2nd primer on a complementary strand.

In the option of this invention, the 2nd primer DNA has arrangement complementary enough to the DNA sequence of the 2nd mold in 3' end. The 2nd primer has the antisense arrangement of the promotor for RNA polymerase, and the antisense arrangement of a transcription initiation site in 5' end.

It is complementary to the DNA sequence of 5' end of the 2nd primer in the 3rd DNA sequence of this invention that carried out the covalent bond to the 2nd mold by the option further.

Also in the option of this invention, the amplification method of a specific nucleic acid sequence is used. In this method, the 1st primer, the 2nd primer, ribonuclease H, RNA dependent DNA polymerase, DNA dependent DNA polymerase, RNA polymerase, ribonucleoside triphosphoric acid, and deoxyribonucleoside triphosphoric acid are mixed with a specimen. Complementary targets for the 1st template RNA with the 1st enough primer DNA have arrangement. The 2nd primer DNA has

arrangement complementary enough, a promotor's antisense arrangement, and the antisense arrangement of a transcription initiation site in the 2nd template DNA recognized by RNA polymerase as a substrate. In the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer, it is complementary enough to the arrangement of a specific nucleic acid sequence, and the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer is fully homologous at the arrangement of a specific nucleic acid sequence. 3' end of the 1st primer is oriented toward 3' end of the 2nd primer on a complementary strand.

Furthermore it is this invention, also in an option, the amplification method of a specific nucleic acid sequence is used. In this method, the 1st primer, the 2nd primer, the Tori myoblastoma virus polymerase, Escherichia coli ribonuclease H, bacteriophage T7 RNA polymerase, ribonucleoside triphosphoric acid, and the DEOKI crimp nucleoside triphosphate are added in a specimen. The 1st primer DNA has arrangement complementary enough in the 1st template RNA. The 2nd primer DNA includes arrangement complementary enough, a promotor's antisense arrangement, and the antisense arrangement of a transcription initiation site in the 2nd template DNA recognized by T7 RNA polymerase as a substrate. It is complementary enough to the arrangement of a specific nucleic acid sequence in the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer, and the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer is sufficient homologous for the arrangement of a specific nucleic acid sequence. 3' end of the 1st primer is oriented toward 3' end of the 2nd primer on a complementary strand.

Example This invention relates to the amplification method of a specific nucleic acid sequence. Amplification is roughly shown in Drawing 1 including mutual composition of DNA and RNA. In this method, single stranded RNA is changed into a single stranded DNA, and this single stranded DNA is changed into the functional mold for multiple copy composition of start single stranded RNA. The 1st primer and the 2nd primer are used with an amplification method. It is complementary enough to the arrangement of a specific nucleic acid sequence in the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer, and the arrangement of the 1st primer or the 2nd primer is fully homologous at the arrangement of a specific nucleic acid sequence. When a specific nucleic acid sequence is duplex deoxyribonucleic acid, for example in some cases, it is complementary enough to the arrangement of a specific nucleic acid sequence, and the both sides of the 1st primer and the 2nd primer are fully homologous.

It is changed into a single stranded DNA by making RNA (the 1st mold) hybridize a RNA oligonucleotide primer (the 1st primer), and compounding complementary strand DNA (the 1st DNA sequence) from the 1st primer using RNA dependent DNA polymerase. For example, the single stranded DNA (the 2nd mold) obtained by using specific RNase (for example, ribonuclease H) for hydrolysis and the RNA-DNA hybrid of the 1st mold is separated from the 1st mold. The 2nd mold is changed into the gestalt in which RNA biosynthesis is possible. This conversion hybridizes the synthetic oligonucleotide (the 2nd primer) which has the arrangement which includes arrangement complementary enough at the 3' end, and includes a promotor's antisense strand and the antisense arrangement of a transcription initiation site toward 5' end in 3' end of the 2nd mold. It is carried out by compounding the 2nd DNA sequence that carried out the covalent bond to 3' end of the 2nd primer using the 2nd mold as a mold, and compounding the 3rd DNA sequence that carried out the covalent bond to 3' end of the 2nd mold using DNA dependent DNA polymerase using the 2nd primer as a mold. The functional derivative of the 2nd obtained mold is the 3rd mold, this is used and the multiple copy of RNA which is the 1st mold is compounded using specific RNA polymerase to the promotor and transcription initiation site which are specified by the 2nd primer. By repeating a cycle, each of the 1st mold compounded newly may be further changed into the copy of the 2nd mold and the 3rd mold. A repetition of a cycle makes a user's intervention or operation unnecessary.

An amplification method is started by adding the suitable mold nucleic acid for an enzyme suitable under a suitable reaction condition, a primer, and cofactor. This mold nucleic acid is a gestalt in which homogeneous and continuous amplification is possible.

It functions as an intermediate in the cycle shown in Drawing 1.

In an amplification method, consumption of the net (net) of a precursor (a primer, ribonucleoside triphosphoric acid, and deoxyribonucleoside triphosphoric acid) and accumulation of the net of a production thing (RNA and DNA) arise. The synthetic process of RNA and DNA advances un-intratemporally until the nucleic acid of enough levels for detection is compounded. An amplification process may be pursued by composition of the sign production thing from for example, a sign precursor.

Amplification may add or substitute the process roughly shown in Drawing 1, and may also include another process. It may generate in the low speed which can permit a certain kind of reverse production nature (counter productive) enzyme reaction. One of the un-producing nature side reactions expected is composition of RNA under the nonexistence of mold nucleic acid, and/or DNA. What is necessary is just to judge the existence of the specific sequence detected only between two priming parts of a specific nucleic acid sequence, in order to discriminate this RNA and/or a DNA product from a request production thing.

The 1st primer is oligodeoxyribonucleotide to which a complementary target fully has arrangement in 3' end of the 1st mold at the 3' end. The arrangement of 3' end of the 1st primer has sufficient specific length and base composition to compound the 1st DNA sequence specifically efficiently under given ionic strength conditions and temperature conditions. In the 1st cycle, to the field inside 3' end of the 1st mold, it is complementary enough and the 1st primer is obtained. Probably, in a subsequent cycle, it will be complementary to 3' end of the 1st mold in 5' end of the 1st primer. It is thought that a part or all of the 1st primer may comprise nucleotides or nucleotide analogs other than natural deoxyribonucleotide. 5' end of the 1st primer may include the arrangement which is not complementary in the 1st mold in the 1st cycle. being complementary to fixable nucleic acid in a non-complementary sequence -- or detection -- the useful nonnuclear acid component and combination like an easy reporter may be possible. Or the non-complementary sequence may include a promotor's antisense arrangement and the antisense arrangement of the transcription initiation site which can be used for RNA biosynthesis. This RNA may be used for the 1st mold as an intermediate by complementary and another amplification cycles.

The 2nd primer is oligodeoxyribonucleotide to which a complementary target fully includes arrangement in 3' end at the 3' end of the 2nd mold. the 2nd primer compounds the 2nd and 3rd DNA sequences specifically efficiently under given ionic strength conditions and temperature conditions -- making -- it has sufficient specific length and base composition. The 2nd primer includes a functional promotor's antisense arrangement, and the antisense arrangement of a transcription initiation site. This arrangement includes sufficient information for making it carry out with specific efficient combination of RNA polymerase, and the transcription initiation in a desired region, when used as a mold for composition of the 3rd DNA sequence. A promoter sequence may originate in a functional promotor's antisense strand. A transcription initiation site may originate in 5' terminal sequence of a natural RNA transcript. In a suitable embodiment, 5' terminal sequence of the 2nd primer is AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG. This arrangement includes the antisense arrangement of the promotor for T7 RNA polymerase, and the antisense arrangement of a transcription initiation site. Or the another transcription initiation site and promotor for phage RNA polymerase may be used. The arrangement which is not related to a promoter function may be included between the arrangement of 3' end and the transcription initiation site which it is contained at the 5' end of the 2nd primer, or are hybridized to the 2nd mold. A part or all of the 2nd primer may comprise nucleotides or nucleotide analogs other than natural deoxyribonucleotide.

All the enzymes used by this invention need to make some practical use standards satisfy. Each of an enzyme or enzyme preparation things, In exonuclease or endonuclease specific to a certain kind of DNA polymerase and a single chain, or a double chain. Don't have harmful RNase ("RNase") activity like the exonuclease activity of 5'- often seen or 3'-. Each of an enzyme or enzyme preparation things must not have the harmful RNase ("RNase") activity except for addition of the specific and suitable ribonuclease activity (for example, ribonuclease H) for the hybrid of RNA and DNA. Each enzyme must be activity at a grade suitable under the general reaction condition used in a non-enzyme process which hybridizes an oligo KUREOCHIDO primer to other enzyme processes and RNA, or DNA molds.

What kind of enzyme which can start in vitro composition of RNA specifically by the predetermined start site which could combine with the specific DNA sequence by which a designation is carried out to a promotor, and approached the promotor extremely may be sufficient as the DNA dependent RNA polymerase used by this invention. A promotor and a start site form a part of 2nd primer. RNA polymerase needs to be able to compound some RNA copies per functional copy of a mold to within a time [suitable]. Bacteriophage T7 RNA polymerase is used in a suitable embodiment. Use of another bacteriophage RNA polymerase, for example, phage T3, phage phi II, and Salmonella phage sp6 or Pseudomonas phage gh-1 is also possible. In another embodiment, a prokaryotic cell or eukaryotic cell DNA dependent RNA polymerase may be used. To use another RNA polymerase, it is necessary to change arrangement and start arrangement for the promotor of the 2nd primer suitably according to the mold singularity of specific RNA polymerase.

What kind of enzyme which can compound DNA from an oligo DEOKISHIBO nucleotide primer and a RNA mold may be sufficient as the RNA dependency DNA dependent DNA polymerase used by this invention. This enzyme may include DNA-dependent-DNA-polymerase activity and RNase H activity further. In a suitable embodiment, the Tori myoblast virus polymerase ("AMV reverse transcriptase") is used. RNA dependent DNA polymerase may originate in another retrovirus, for example, the Moroni (Maloney) murine leukemia virus. Or another eukaryotic cell RNA dependent DNA polymerase may be used.

What kind of enzyme which can compound DNA from an oligodeoxyribonucleotide primer and a DNA mold may be sufficient as the DNA polymerase used by this invention. This enzyme must not have the 5'- or 3'-exonuclease activity relevant to many kinds of DNA polymerase. Although AMV reverse transcriptase is used in the suitable embodiment, the exonuclease activity of 5'- or 3'- can also use the DNA dependent DNA polymerase which originally lacked. The examples of such polymerase are some eukaryotic cell DNA polymerase alpha or beta, for example, DNA polymerase, and DNA polymerase isolated from the mammals organization like calf ****. If common, unsuitable DNA polymerase will also become useful if unnecessary exonuclease activity is removed by performing the denaturation of a DNA polymerase gene, and the manifestation of the denaturation polymerase in the inside of a suitable host cell one by one, or embellishing DNA polymerase protein chemically again. It is, even if it may be prepared from the Klenow (Klenow) fragmentation of the Escherichia coli polymerase I or is prepared from bacteriophage T7 DNA polymerase, and denaturalized type DNA polymerase is **. In a suitable embodiment, since the both sides of RNA-dependent-DNA-polymerase activity and DNA-dependent-DNA-polymerase activity are given with the same enzyme, It will be understood that the denaturalized type DNA-dependent-DNA-polymerase activity like the above is added as a supplement of the activity resulting from RNA dependent DNA polymerase.

What kind of enzyme which can hydrolyze RNA annealed by complementary DNA may be sufficient as RNase H which may be used by this invention. This enzyme must not hydrolyze RNA or any DNAs of a single chain or a double chain, either. Escherichia coli RNase H is used in a suitable embodiment. Use of another RNase H enzyme, for example, calf thymus RNase H, is also possible.

Since RNase H is the intrinsic activity of AMV reverse transcriptase, in the suitable embodiment, RNase H of AMV reverse transcriptase is added to Escherichia coli RNase H. What kind of another enzyme which may separate the 2nd mold from the 1st mold may be used.

Said enzyme and a primer are mixed together with the reaction vessel into which buffer solution and cofactor required for the both sides of DNA synthesis and RNA biosynthesis were put. The suitable ion conditions and reaction temperature for making DNA and a DNA mold hybridize a primer specifically so that it may be publicly known to a person skilled in the art are given. The reaction mixture must not contain the substance which blocks an amplification method, for example, the substance which check the activity of an enzyme substantially or block hybridization with a primer and a mold or into which a nucleic acid intermediate and a production thing are made to disassemble in un-producing.

Some detection procedures considered to be useful for application of an amplification method are explained. It will be understood that the detection means of the nucleic acid compounded with this amplification method is not limited to the procedure of memory and that use of another detecting method is possible.

In one embodiment of a detection procedure, a labeled precursor can be added to a reaction mixture. Amplification is detected by the quantitative analysis or qualitative analysis of a sign production thing separable [into a person skilled in the art] from a sign precursor using a publicly known method.

The ribonucleoside triphosphoric acid which detects RNA biosynthesis may be sufficient as a sign precursor, and the guanine deoxyriboside triphosphoric acid or the oligonucleotide primer which detects DNA synthesis may be sufficient as it. A radioactive isotope may be sufficient as the type of a sign, the hapten which can be combined with the useful chemical group like biotin, a chromophoric group, a fluorescence chromophoric group, or an antibody may be sufficient as it, or protein or an enzyme may be sufficient as it. A sign production thing may be separated from a sign precursor based on solubility, an electric charge, or size. It may hybridize to the nucleic acid which can fix the sign DNA or RNA including complementary arrangement.

In another embodiment, it is combined with immobilization support, and the production thing of an amplification method is hybridized by the nucleic acid probe including complementary arrangement, and may be separated from the non-hybridizing nucleic acid probe which remains in a solution further. The production thing slack DNA or RNA may be coupled directly with a solid support by a stable interaction like **** electrostatic or a share interaction. A production thing may also contain a chemical group of a certain kind like the biotin which may be incorporated into the production thing by an amplification method at the time combined with fixed protein (for example, avidin or a SUTOREPUTO horse mackerel bottle). A production thing may be hybridized by the nucleic acid which can be fixed including complementary arrangement. A nucleic acid probe includes the complementary arrangement which forms the production thing of an amplification method, and an interaction stable enough, in order to make it join together continuously under the conditions which occur combination under a hybridization condition and are used for removal of a non-hybridizing nucleic acid probe. In a suitable embodiment, complementary arrangement originates in the arrangement part of the specific nucleic acid sequence which exists between the 1st primer arrangement and the 2nd primer arrangement. A single stranded DNA or RNA may be sufficient as a nucleic acid probe, the duplex deoxyribonucleic acid or RNA made to a single chain may be sufficient as it, or the oligonucleotide which may comprise deoxyribonucleotide and/or ribonucleotide may be sufficient as it. The nucleic acid probe may contain the chemical group which can carry out a covalent bond to a DNA product or a RNA product under a suitable condition. The sign of the nucleic acid probe may be carried out by the hapten which can be combined with a radioactive isotope, the useful chemical group like biotin, a chromophoric group, a

fluorescence chromophoric group, or an antibody. The nucleic acid probe can form a complex with the enzyme like protein or phosphatase, and peroxidase further. The nucleic acid probe may include the arrangement of a certain kind which can carry out in vitro reproduction of the probe further. It is possible to analyze the production thing of this amplification method with the typical nucleic acid disposal method which progressed by molecular-cloning art. In one method, a synthetic DNA is decomposed by restriction endonuclease, it dissociates with an electrophoresis method, and composition of a specific DNA sequence can be detected by detecting by a publicly known method in this industry. In an option, the DNA synthesis which used RNA dependent DNA polymerase, the 1st primer, and dideoxynucleoside triphosphate can determine the arrangement of amplification RNA (1988, such as Stoffet). In an option, the arrangement of the 3rd mold amplified by the RNA biosynthesis using the DNA dependent RNA polymerase and 3'-deoxyribonucleoside triphosphoric acid which were used with this amplification method can be determined (Axelrod & Kramer, 1985). Probably, in the option, amplification RNA encodes the polypeptide by which in vitro translation may be made. In The polypeptide production thing by which vitro translation was made may be analyzed using an antibody.

or [that it is expected that a specific nucleic acid sequence is compounded] --- or the specimen in which it has become clear that it contains is added to a reaction mixture with the gestalt of the mold nucleic acid in which homogeneous continuation amplification is possible. What kind of intermediate in the cycle of Drawing 1 may be sufficient as this reaction mixture? The single stranded RNA which fully includes the arrangement of homologous at the 5' end with the arrangement which exists in 3' end of the 2nd primer, and includes arrangement complementary enough in the 1st primer may be sufficient as especially mold nucleic acid. The mold nucleic acid of this gestalt will function as the 1st mold in this amplification method. Or the single stranded DNA which includes arrangement mutual enough in the arrangement which includes 3' end and the arrangement complementary enough of the 2nd primer at the 3' end at least, and exists in 3' end of the 1st primer may be sufficient as medium size nucleic acid. The mold nucleic acid of this gestalt will function as the 2nd mold in this amplification method. Or the duplex deoxyribonucleic acid in which one chain includes the 1st primer and arrangement complementary enough at the 5' end including the full arrangement of the 2nd primer may be sufficient as mold nucleic acid. Duplex deoxyribonucleic acid functions as the 3rd mold in this amplification method.

Some examples of the mold nucleic acid formation procedure in which it seems that it is useful for application of an amplification method although preparation of mold nucleic acid does not constitute a part of this amplification method are explained below. However, it will be understood that an option can also be used without limiting a mold nucleic acid formation procedure to various procedures of a statement.

In one example of a mold nucleic acid formation procedure, the mold nucleic acid which may function as the 1st mold is natural origin RNA, or may be the RNA fragmentation which may be generated from a larger RNA molecule using a publicly known site-specific hydrolysis method (1987, such as Shibahara) in this industry.

In another example, the mold nucleic acid which may function as the 2nd mold may be prepared from the duplex deoxyribonucleic acid which has a part which may be digested by direct relation (flanking) and restriction endonuclease in arrangement complementary enough in 3' end of the 2nd primer.

In another example, the mold nucleic acid which may function as the 2nd mold is prepared from the single stranded DNA or RNA which the oligonucleotide which can prevent DNA synthesis was made to hybridize. This element oligo NUKURECHIODO may also contain the chemical group which can carry out a covalent bond to a mold under a suitable condition. If DNA is compounded from this prevented mold using the 1st primer, a synthetic DNA with the same 3' end as the 2nd mold will be

obtained. When a start mold is RNA, the DNA-RNA hybrid obtained may be directly used as mold nucleic acid. When a start mold is DNA, the copy of the 2nd obtained mold may be separated from a start mold by a chemical or thermal modification method.

In another example, the mold nucleic acid which functions as the 3rd mold is prepared from the single stranded DNA or RNA by which DNA synthesis was carried out from DNA or the RNA mold using the 2nd primer. The obtained synthetic DNA is separated from a start mold using a chemical or thermal modification method. Chemical or a RNA mold is hydrolyzed using enzymatic means. A complementary target fully includes arrangement in the 1st primer with the arrangement of the 2nd primer in which the obtained single stranded DNA carried out the covalent bond to 5' end. This single stranded DNA can be changed into duplex deoxyribonucleic acid with a transfer function by hybridizing the 1st primer to a single stranded DNA, carrying out a covalent bond to the 1st primer further, and compounding a complementary DNA sequence to a single stranded DNA. chemical in the example according to pan — a single stranded DNA or a RNA mold can be obtained from duplex deoxyribonucleic acid, double stranded RNA, or a DNA-RNA hybrid using enzymatic means thermally or arbitrarily. Next, the mold nucleic acid which functions as the 1st, 2nd, or 3rd mold from the obtained single stranded DNA or RNA is generated using either of the above-mentioned mold nucleic acid formation procedures. It is also possible to prepare mold nucleic acid, using simultaneously another procedure in which the chain (complementary) of another side of the procedure in which one chain of the 1st primer and nucleic acid involves, the 2nd primer, and nucleic acid involves.

The oligonucleotide was compounded using material and a method material Applied Biosystems380A DNA synthesizer. The column, HOSUFORAMJITTO (phosphoramidites), and the reagent which were used for oligonucleotide synthesis came to hand from Applied Biosystems and Inc. via Tech-nical Marketing Associates. The oligonucleotide was refined using polyacrylamide-gel-electrophoresis **** DEAE cellulose ROMATOGURAFI one by one. Radioactive isotope [α - 32 P] UTP (800 Ci/mmol) came to hand from Amersham. The enzyme which separates and combines DNA was used as the directions for use of the manufacturer who purchased from New England Biolabs. The preparation things containing the large fragmentation of DNA polymerase 1 (Klenow) were also purchased from New England Biolabs. RNasin and T7 RNA polymerase were purchased from Promega Biotes via Bio/Can Scientific Inc. Reverse transcriptase and RNase H came to hand from Pharmacia. Proteinase K came to hand from Boehringer Mannheim Canada. It used 101 shares (ATCC33694) of Escherichia coli HB for all the transformations. Plasmid pUC19 (1983, such as Norrander) was purchased from Bethesda ResearchLaboratorie s.

Isolation and sequencing of DNA The Escherichia coli transformation medium was proliferated by YT culture medium (Miller, 1972) containing 50 microg/ml ampicillin. Plasmid DNA was refined by the high-speed boiling method (Holmes & Quigley, 1981). The DNA fragment and vector which were used for all the construction were separated by low melting point agarose electrophoresis, and phenol extraction and ethanol precipitate refined from dissolution agarose (1982, such as Mania-tis). Plasmid DNA sequencing was carried out using the correcting method (1985, such as Hattori) of a dideoxy procedure (1977, such as Sanger). The -20 universal primer (New England Biolabs) was used for the reaction start.

TCA precipitate It controlled in EDTA of 10mM of aliquot (5micro**) 20micro** of an amplification reaction, and it maintained to Hikami until collection of all the specimens of every fixed time finished. Next, the controlled specimen was applied to the glass filter disk, and it dipped promptly into ice-cooling 5% trichloroacetic acid (TCA)-1% of sodium pyrophosphate, and sometimes agitated for 10 minutes. Next, it washed twice [every / a for / 5 minutes] by 5% of ice-cooling TCA, washed twice [further] by ethanol 95%, and hardened by drying by freezing. Radioactivity was measured with the liquid scintillation counter.

a polyacrylamide-gel-electrophoresis specimen (1-6micro**) — the formamide color (a 90% deionization formamide.) of 4-5micro** It mixed with TrisHCl (pH 8.0) of 10mM, EDTA of 1mM, KISHIRENSH1 anol, and a bromophenol blue, and applied to the 7% denaturation polyacrylamide gel of the 12-cm length before voltage impressing (pre-run). 350 volts was impressed to gel until the bromophenol-blue color reached the pars basilaris ossis occipitalis. Gel was fixed and it dried, before applying at autoradiography in some cases. immobilization — 10% methanol 7% — it carried out by washing for 15 minutes in acetic acid. The profile of the RNA product separated by this method was visualized at the room temperature with autoradiography.

The design of the oligonucleotide for example 1gag test systems, and a synthetic EcoR I part, Synthetic DNA arrangement was designed include T7 phage promotor, arrangement required for the transcription initiation by T7 RNA polymerase, and the hybridization field (hybridization field 1) of 19bp (theA [2] figure). The antisense oligonucleotide chain (T7H1.GAG) of 47b which participates in cloning of these components functions also as the 1st primer. The hybridization field 2 has separated 53bp from the hybridization field 1, and is length 20bp. The primer formed to this field (H2.GAG) is duplication of the sense oligonucleotide chain of 20b, and is not used for cloning. Arrangement including the whole hybridization field is a segment of 92bp of the gag portion of the HTLV-III genome which is a causative agent of an acquired immunodeficiency syndrome. There is a reason for having chosen this specific gene segment in that it was expected that a primer hybridized effectively and an interval being comparatively short between two hybridization fields. In order to make cloning easy, the Xba I part has been arranged at the end of arrangement. gag test arrangement includes again the Sal I part and Pst I part which make screening of recombinant easy.

A total of four oligonucleotides were used in crowing of this fragmentation. N1.GAG used for construction of gag test arrangement and gag2 test arrangement completes an antisense strand, and is used only in a cloning process. T74.PRO is T7 promotor's sense strand ingredient. However, N2.GAG was used for construction of both examination fragmentation, and was used as two steps of intermediates (the 2nd mold) of amplification cycles. The gag examination fragmentation by which cloning was carried out thoroughly can constitute the intermediate (the 3rd mold) of amplification cycles. If cloning is carried out in a suitable vector, gag examination DNA will be transferred by T7 RNA polymerase, and will produce the RNA fragmentation (the 1st mold) useful as an amplification intermediate which participates in three stages. Furthermore, T7H1.GAG and H2.GAG function also as a primer of a test system.

Although gag2 examination synthetic DNA fragmentation (theB [2] figure) does not contain T7 promotor, it is the same as that of gag test arrangement, therefore the both sides of N1.GAG and 2.GAG participated in the construction. [of the remaining portion of arrangement] The designation of the oligonucleotide required for completion of an antisense strand is carried out to H1.GAG. Once cloning is carried out, gag2 examination fragmentation can be used as a mold which examines amplification, using a DNA restriction fragment as mold nucleic acid.

Construction of an example 2gag examination plasmid Tris of 70mM. Oligonucleotide T74.PRO and N1.GAG (every 2microg) were independently phosphorylated for 30 minutes at 37 ** in the 20micro** reactant containing HCl (pH 7.6), MgCl₂ of 10mM, DTT of 5mM, ATP of 0.5mM, and T4 polynucleotide kinase of five units. T74.PRO and N1.GAG (every 10micro**) which were phosphorylated were mixed with non-phosphorylating T7H1.GAG of 1microeach g and N2.GAG, and NaCl of Tris HCl(pH 7.8)-500mM of 100mM of 3micro**, and it was made last capacity [for gag examination assemblies / of 29micro] **. The gag2 examination mixture contained phosphorylation N1.GAG of 10micro**, non-phosphorylating H1.GAG of 1microeach g and N2.GAG, and NaCl of TrisHCl(pH 7.8)-500mM of 100mM of 1.8micro** in last capacity [of 18micro] **. The oligonucleotide mixture was made to hybridize independently by maintaining for 10 minutes at 90

, and cooling radiationally to a room temperature slowly in 10 to 16 hours. In order to combine the hybridized oligonucleotide, the reactant of 60micro containing Tris HCl (pH 7.8) of 50mM, $MgCl_2$ of 10mM, DTT of 20mM, ATP of 1mM, and 50 microg/ml BSA was used. T4 DNA ligase of 400 units was added to the gag examination reactant, and it incubated at 15 ** for 2 hours. The gag2 examination reactant incubated to T4 DNA ligase of 200 units, and ** for 14 to 16 hours. The synthetic DNA segment which isolated with plasmid pUC19 straight-line-sized, and was refined was mixed by cutting by the restriction enzyme part inside a polylinker field. gag test arrangement was combined with the EcoR I-Xba I fragmentation of pUC19 using T4 DNA ligase. gag2 test arrangement was combined with Sma I-Xba I fragmentation. transforming Escherichia coli into the transformant obtained after these reactions using the plasmid DNA of the origin, and screening by restriction analysis — sequence analysis — the last plasmid (pGAG.TEST and pGAGL2.TEST) — the right — things were determined.

In order to amplify RNA transferred from the influence gag examination oligonucleotide of the primer concentration to example 3RNA amplification. The used reaction mixture (25micro**) Tris of 50mM. HCl. (pH 8.45), $MgCl_2$ of 6mM, KCl of 40mM, dithiothreitol of 10mM, and NTP (ATP.) of 0.5mM CPT, GTP, UTP, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) of 1mM, RNasin of 20 units, T7 RNA polymerase of ten units, the reverse transcriptase of ten units of T7 RNA poly MERAZETO [ten units of], and RNase of 0.4 unit. H and 10-microcurie [α - ^{32}P] UTP were contained. Two reactants contained N2.GAG of 0.5ng (0.015pmoles), and, on the other hand, other two reactants did not contain the mold. Each of primer T7H1.GAG and H2.GAG was added to the mold reactant of N2.GAG content or not containing, by last concentration 3.4microM or 0.3microM. The reactant was incubated at 42 ** for 2 hours. The RNA total composite quantity was monitored by measuring the incorporation of TCA insoluble cpm every 30 minutes. The influence of primer concentration on mold dependency RNA biosynthesis is shown in Table I. PAGE and autoradiography analyzed the aliquot of each reaction containing equivalent weight of synthetic RNA (Drawing 3, the same number lanes 1-4 as a reaction).

表
I
N2.GAGからの2時間後のRNA増幅

反応	各プライマー濃度(μM)	鋳型 (ng)	合成RNA(μg)
1	3, 4	0.5	2.8
2	3, 4	—	2.1
3	0, 34	0.5	1.8
4	0, 34	—	0.7

Although the reaction 1 showed the isotope incorporation of the peak, the reaction 2 which is a contrast mold also showed the high rate of incorporation (73% of the reactions 1), and showed the extremely similar electrophoresis profile. Therefore, even if a mold does not exist at all in the amplification under high concentration primer existence, the RNA transcript of size equal to the expected size is produced. The result obtained using the specimen of 1/10 of primer concentration showed the remarkable difference. Although the quantity of RNA produced at the reaction 3 was 2.6 times the reaction 4, in the reaction 3, transfer objects were detected [no] in the single band of the expected size in ***, and the fragmentation which exceeds 60-70b in the reaction 4 was detected. Therefore, primer concentration plays a role important for the accuracy and efficiency of RNA amplification.

In order that production by a multiplier system might show the size of the fragmentation expected, the contrast RNA transcript was prepared by transfer from an examination plasmid (lane 0 of Drawing 3). pGAG.TEST was cut and straight-line-sized by Xba I, by proteinase K, phenol extraction

was processed and (1982, such as Maniatis) carried out, and ethanol precipitate was carried out. Next, T7 RNA polymerase was used as a manufacturer's directions for use, and the fragmentation from which 0.5microg was obtained was transferred in the reaction mixture of 25micro** containing 10microgCi[alpha-32P] UTP.

The standard reaction mixture of 50micro** used in order to amplify RNA transferred from the influence gag examination oligonucleotide of the mold concentration to example 4RNA amplification, T7H1.GAG of 0.34microM. H2.GAG of 0.34microM, and Tris of 50microM. HCl (pH 8.45), MgCl₂ of 6mM, KCl of 40mM, DTT of 10mM, NTP of 0.5mM, dNTP of 1mM, RNasin of 40 units, the T7 RAN polymerase of 20 units, the reverse transcriptase of 20 units, and RNase of 0.8 unit. H and 10-20-microcurie[alpha-32P] UTP are contained, the mold (N2.GAG) of various quantity of the range of 1ng to 1fg is contained, and one reaction does not contain a mold. The reaction was incubated at 42 ** for 3 hours, and the RNA total composite quantity monitor was carried out by measuring the incorporation of TCA insoluble cpm every 30 minutes from the start of an incubation. As shown in Table II, there are more RNA total composite quantities in all the *****ed of a mold than contrast not containing a mold. The RNA total composite quantity decreases with the fall of mold concentration. ***** is not quantitative. Generally the amplification of RNA per start mold is so large that mold concentration is low. when RNA of 0.8microg is compounded from the N2.GAG mold of 1fg, it means that one times the amplification of 8×10^8 was obtained The 102-b N2.GAG oligonucleotide of 1fg shows an abbreviation 2×10^4 molecule.

RNA-amplification-reactions mold composition RNA (mug) amplification magnification 1 3 hours after table IIN2.GAG

1ng	3.5	3.5×10^{-2}	100pg	4.4	4.4×10^{-4}	3 10pg	4.1	4.1×10^{-5}	1pg	3.0	3.0×10^{-5}
100fg	2.7	2.7×10^{-6}	10fg	1.9	1.9×10^{-7}	1fg	0.78	7.8×10^{-8}	- 0.046 RNA compounded 3 hours after - reaction. It analyzed by PAGE at given mold concentration (Drawing 4, the lanes 1-8 of the same number as a reaction). The main band which shows RNA of the abbreviation 100b existed in all the reactions except mold the reaction of mold 1fg content and not containing. Although the production thing of 100b was not included so much at the reaction containing the mold of 1fg in 3 hours, the RNA total composite quantity showed the difference and more nearly qualitative than mold a non-containing reaction.		

Hybridization analysis of an example 5RNA product The amplification reaction which deletes only radioactive label UTP of the procedure of Example 4, and contains the N2.GAG mold of various quantity of the range of 1pg - 0.1fg was performed. The reaction was incubated at 42 ** for 3 hours. The aliquot was extracted from each reaction every 30 minutes, and it applied to nylon membrane (Amersham). The nucleic acid contained in these reaction aliquots was fixed by UV irradiation. The formamide, 5xSSC, and the 5xDenhardt solution (Maniatis etc. 1982;Southern etc.) of 50% of last concentration v/v Comprise 1975 and a film is pre hybridized at 50 ** for 1 hour in the pre hybridization buffer solution of a quantity equal to 5 ml per 100-cm^2 . Furthermore, it hybridized using the hybridization solution of the radioactive label probe of specific activity 10^6 cpm/ml. Hybridization was performed at 50 ** for 16 hours in 50% of a formamide, 5xSSC, and a 5xDenhardt solution (1975, such as 1982;Southern(s), such as Maniatis). The radioactive label probe was synthetic oligo NUKURECHIODO5'GATCTGGGATAGAGTACATCCA3' which carried out the sign of the 5' end using T4 polynucleotide kinase and ATP (alpha-32P). Next, the film was continuously washed at least 2 and 3 times or more at 50 ** using the penetrant remover which comprises 2xSSC, 0.1%v/v SDS, and 0.2xSSC and 0.1%v/v SDS (1979, such as 1982;Szostak(s), such as 1975;Maniatis(es), such as Southern).

Drawing 5 is performed by the amplification reaction containing the N2.GAG mold of various quantity extracted by different incubation time, or shows the result of hybridization analysis.

Each of the sequence of the length of Drawing 5 shows the time of differing (1 two in 30 minutes for 60 minutes.). As for 3, 5 shows [for 90 minutes] the addition of a horizontal line which is the versatility of an N2.GAG mold respectively 4 for 180 minutes for 150 minutes for 120 minutes, as for 6 (as for 1fg and 5, in 10fg and 4, 0.1fg and 6 are [1 / 1pg and 2 / 100fg and 3] mold un-adding). Although amplification of the nucleic acid hybridized to the sign probe in the lines 1-3 (1pg - 10fg) was observed, in the lines 4 and 5 (1fg and 0.1fg), it was not more prosperous than the hybridization line 6 (mold un-containing) to specific nucleic acid. It is presumed that nonspecific combination of the appearance of the sign probe of the line 6 is connected with DNA or RNA biosynthesis. This is because a hybridization signal increases temporally.

Use of the DNA restriction fragment as example 6 mold Cut plasmid pGAG2.TEST by Msp I, processed by proteinase K, phenol extraction and ethanol precipitate refined, and it was made to boil for 5 minutes, and denaturalized. It analyzed by performing an amplification reaction in the same procedure as Example 4 except using as a mold pGAG2.TEST which carried out Msp I decomposition instead of the N2.GAG oligonucleotide. The addition of the plasmid to each reaction is the range of 55ng - 5.5pg, and a mold was not added for one reaction. In order to simulate additional DNA which should exist in a actual specimen, another reaction containing calf thymus DNA of 1ng which cut similarly, refined and denaturalized was also prepared. RNA biosynthesis was measured by TCA precipitate and PAGE analysis after a 3-hour incubation at 42 **. As shown in Table III, there were more RNA total composite quantities by all the examination concentration of a mold than mold non-containing contrast. Based on RNA biosynthesis being equivalent to 1.8% of the total plasmid DNA, amplification was calculated from the actual mold.

The RNA total composite quantity (amplification) from a specific initial mold concentration level showed the value with an always low restriction fragment (Table III) as compared with the synthetic oligonucleotide mold (Table II). This reason will be for competition with the complementary strand of a restriction fragment to arise under a service condition.

表 III
Msp I 一分解pGAG2.TESTから
のRNA増幅

反応	鋳型*	合成RNA**	増幅倍率**
1	55, 0ng [1ng]	3, 65	3.7×10^3
2		(4, 05)	(4.1×10^3)
3	5, 5ng [100pg]	3, 54	3.5×10^4
4		(3, 16)	(3.2×10^4)
5	550, 0pg [10pg]	2, 29	2.3×10^6
6		(2, 79)	(2.8×10^6)
7	55, 0ng [1pg]	2, 62	2.6×10^4
8		(0, 87)	(0.7×10^4)
9	5, 5pg [100fg]	1, 37	1.4×10^7
10		(2, 26)	(2.3×10^7)
11		1, 25	
12		(0, 08)	

* カギ括弧内の数値はN2, GAG均等量を示す。

** 括弧内の数値は1μgのMsp I 一分解子
ウシ胸腺DNAの存在下のRNA合成を示す。

RNA compounded after a 3-hour reaction was analyzed by PAGE (Drawing 6, the lanes 1-6, 11, and 12 of the same number as a reaction). Although the main band which shows RNA of the abbreviation 100b existed in the reactions (lane 1-6, this band did not exist in mold a non-containing reaction (lanes 11 and 12). RNA of the lane 0 is standard RNA prepared in the procedure of Example 3. There was no apparent qualitative difference between synthetic RNA (lanes 2, 4, and 6) or non-adding composition RNA (lanes 1, 3, and 5) which added Msp I-decomposition calf thymus DNA of 1microg.

Use of the RNA fragmentation as example 7 mold Plasmid pGAG.TEST was cut by Xba I, it processed by proteinase K, and phenol extraction and ethanol precipitate refined. RNA of arrangement complementary to N2.GAG was transferred from the pGAG.TEST plasmid straight-line-ized using T7 RNA polymerase. Obtained RNA was decomposed by DNase (Pro Mega BioTec), and phenol extraction and ethanol precipitate refined. According to the procedure of Example 5, refining RNA was used as a mold of an amplification reaction. For each reaction, RNA of various quantity of the range of 55ng - 5.5pg was added, and a mold was not added for one reaction again. According to the procedure of Example 5, composition of specific RNA was judged by the hybridization to a sign oligonucleotide probe after a 3-hour incubation at 42 **.

Amplification of the use local array of the ribosomal RNA as example 8 mold Two primers were used in order to amplify an RNA sequence complementary in a part of Escherichia coli 16S ribosomal RNA (rRNA). One primer T7H18IB3.PR2

(AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTATTACCGCGGCTGCTG) includes complementary arrangement in T7 promoter's antisense strand, start site, and 16S rRNA. It is complementary in primer RIBB.PR (AATACCTTTGCTCATTGACG) of another side to DNA compounded as a mold as a primer using 16S rRNA using T7H1RIB3.PR2. It is complementary to the RNA product of an amplification reaction in 3rd synthetic oligonucleotide RIB5.PR (AGAAGCACCGGCTAAC) that can be used for detection of amplification. It is complementary to a start rRNA mold in this RNA product.

A reaction mixture (25micro**), Tris of 50mM, HCl (pH 8.45), MgCl₂ of 6mM, KCl of 40mM, DTT of 10mM, 0.5-m NTP, dNTP of 1mM, RNasin of 20 units, T7 RNA polymerase of ten units, the AMV reverse transcriptase of ten units, and RNase of 0.4 unit. H, T7H1RIB3.PR2 of 0.34microM, and RIB8.PR of 0.34microM are contained.

Escherichia coli rRNA of various quantity of the range of 50ng - 50fg is added to a reactant. rRNA is not added for one reaction. A reactant is incubated at 42 ** for 3 hours, and an aliquot is extracted in 30 minutes of an incubation start, 60 minutes, 120 minutes, and 180 minutes. The reaction of an aliquot is controlled, and it fixes to nylon membrane, and hybridizes to the RIB5.PR probe which carried out the sign of the 5' end by ³²P in the procedure of Example 5.

Amplification of the use 5' terminal sequence of the ribosomal RNA as example 9 mold The RNA sequence of homologous is amplified to a part of Escherichia coli 16S rRNA using two primers. It is complementary to 16S rRNA in one primer RIB12.PR (TTACTCACCGTCCGCC). Primer T7H1RIB5.PR (AATTCTAATACGACTCACTATATAGGGAGAAATTGAAGAGTTTGATCAT) of another side. It is complementary to 3' end of DNA compounded as a mold using 16S rRNA using a primer and RIB12.PR. It is complementary to the both sides of an amplification RNA product and a start rRNA mold in 3rd synthetic oligonucleotide RIB11.PR

(GTTTCGACTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCC) that can be used for detection of amplification. (to substitute of T7H1RIB3.PR2 and RIB8.PR) T7H1RIB5.PR and RIB12.PR are used as a primer, (to substitute of RIB5.PR) The amplification reaction of rRNA and detection of synthetic RNA are performed like Example 8 except using RIB11.PR as an oligonucleotide probe.

Although the above explained this invention in detail based on the suitable embodiment, probably, it will be clear to a person skilled in the art for various change included by the gist and claim of this invention to be possible.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] it being a method for amplifying a specific nucleic acid sequence, and at temperature which was comparatively alike and was fixed, without adding a reagent one by one, (A) The 1st oligonucleotide primer of (i), the 2nd oligonucleotide primer including a (ii) RNA polymerase promotor's antisense arrangement, (iii) DNA dependent RNA polymerase which recognizes said promotor, (iv) RAN dependency DNA polymerase, (v) DNA dependent DNA polymerase, (vi) RNase which hydrolyzes RNA of a RNA-DNA hybrid without hydrolyzing RNA or DNA of a single chain or a double chain, And a single reaction medium containing (vii) RIBONUKURE oxide triphosphate and deoxyribonucleoside triphosphate is prepared, (B) RNA which consists of the first mold of RNA including said specific nucleic acid sequence, or this specific nucleic acid sequence and complementary arrangement under conditions that an amplification reaction cycle occurs, It provides in said reaction medium and they are after an appropriate time and (C). How to consist of a step which maintains said conditions sufficient time to attain amplification of a request of said specific nucleic acid sequence.

[Claim 2] Said first mold of RNA includes said specific nucleic acid sequence, and it includes that a step (B) provides single stranded RNA in said quality of a reactional solvent, As a result, an oligo NUKURECHIODO primer of the (i) above 1st hybridizes with said single chain RND, (ii) When said RNA dependent DNA polymerase elongates said 1st oligonucleotide primer, using said single stranded RNA as a mold, compound the second mold of DNA, This forms a RNA-DNA hybrid and (iii) aforementioned RNase, RNA which constitutes said RND-DNA hybrid is hydrolyzed, (iv) Said 2nd oligonucleotide primer hybridizes with said second mold of DNA, (v) When said DNA dependent DNA polymerase elongates said second mold of DNA, using said 2nd oligonucleotide primer as a mold, compound an RNA polymerase promotor of functionality, (vi) A method of said DNA dependent RNA polymerase's recognizing said functional promotor, and transferring said second mold of DNA, and making a copy of said first mold of RNA generate by that cause according to claim 1.

[Claim 3] Said 2nd oligo NUKURECHIODO primer includes antisense arrangement of a transcription initiation site to said DNA dependent RNA polymerase further, A method according to claim 1 united so that said antisense arrangement of said RNA polymerase promotor and a function of said antisense arrangement of said transcription initiation site may be possible.

[Claim 4] Said DNA dependent RNA polymerase is bacteriophage T7 RNA polymerase, A method according to claim 1, wherein said antisense arrangement of a transcription initiation site and said antisense arrangement of a functional RNA polymerase promotor become together and constitute the next nucleotide sequence AATTCTAATACGACTCATATAGGGAG.

[Claim 5] A step (B) includes adding a sample in said reaction medium further, and conditions in that

case, It is considered as conditions that said cycle occurs when RNA which consists of the first mold of RNA including said specific nucleic acid sequence, or this specific nucleic acid sequence and complementary arrangement is provided by said sample. And a method according to claim 1 containing a step (D) which monitors said reaction medium about consumption of either said reagent (i), (ii) and (vii), or accumulation of a product of said cycle further after a step (C).

[Claim 6]A method according to claim 4 including detecting a nucleic acid product whose step (D) is said cycle [Claim 7]A method according to claim 5 including that a step (D) detects said nucleic acid product using a nucleic acid probe.

[Claim 8]A method according to claim 5 including that a step (D) detects said nucleic acid product using restriction endonuclease and electrophoresis separation.

[Claim 9]A method according to claim 5 including that a step (D) monitors accumulation of said first mold of RNA.

[Claim 10]A method according to claim 5 including that a step (D) monitors accumulation of said second mold of DNA.

[Claim 11]A method according to claim 5 including monitoring DNA in which a step (D) contains an RNA polymerase promotor of functionality.

[Claim 12]A method according to claim 5 including that a step (D) monitors accumulation of said RNA-DNA hybrid intermediate.

[Claim 13]A step (D) further consumption of either said reagent (i), (ii) and (vii), or accumulation of a product of said cycle, A method according to claim 5 including comparing with a value equivalent to consumption of said reagent in said reaction medium in case said specific nucleic acid sequence, and it and said complementary arrangement do not exist, or accumulation of said product.

[Claim 14]A method according to claim 1, wherein said RNase consists of Escherichia coli ribonuclease H and ribonuclease H of the Tori myeloblastosis virus polymerase.

[Claim 15]A method according to claim 1, wherein said RNase is calf thymus ribonuclease H.

[Claim 16]A method according to claim 1 which said 1st oligonucleotide primer or said 2nd oligonucleotide primer combines with a fixed base material reversibly.

[Claim 17]A way according to claim 1 said DNA dependent RNA polymerase is bacteriophage RNA polymerase.

[Claim 18]A way according to claim 16 said DNA dependent RNA polymerase is bacteriophage T7 RNA polymerase.

[Claim 19]A way according to claim 16 said DNA dependent RNA polymerase is bacteriophage T3 polymerase.

[Claim 20]A way according to claim 16 said DNA dependent RNA polymerase is bacteriophage phi II polymerase.

[Claim 21]A method according to claim 16, wherein said DNA dependent RNA polymerase is Salmonella bacteriophage sp6 polymerase.

[Claim 22]A method according to claim 16, wherein said DNA dependent RNA polymerase is Pseudomonas bacteriophage gh-1 polymerase.

[Claim 23]A method according to claim 1, wherein said RNA dependent DNA polymerase is a retroviral reverse transcriptase.

[Claim 24]A method according to claim 22, wherein said retroviral reverse transcriptase is avian myeloblastosis virus polymerase.

[Claim 25]A method according to claim 22, wherein said retroviral reverse transcriptase is the Moroni (Moloney) murine leukemia virus polymerase.

[Claim 26]A method according to claim 1, wherein said DNA dependent RNA polymerase does not have exonuclease activity.

[Claim 27]A way according to claim 1 no DNA polymerase in said reaction medium also has DNA

exonuclease activity and DNA endonuclease activity.

[Claim 28] A way according to claim 1 said DNA dependent DNA polymerase is avian myeloblastosis virus polymerase.

[Claim 29] A way according to claim 1 said DNA dependent DNA polymerase is DNA polymerase α or DNA polymerase β .

[Claim 30] A way according to claim 1 said DNA dependent DNA polymerase is calf thymus DNA polymerase.

[Claim 31] A method according to claim 1 of consisting of a step (C) maintaining said conditions for 30 minutes – 4 hours.

[Claim 32] A method according to claim 1 containing a step which clones an account DNA product of back to front which combined a DNA product of said cycle with a cloning vector.

[Claim 33] A method according to claim 31 containing a step which makes a product which said DNA product of said cycle encodes reveal by an expression system.

[Translation done.]

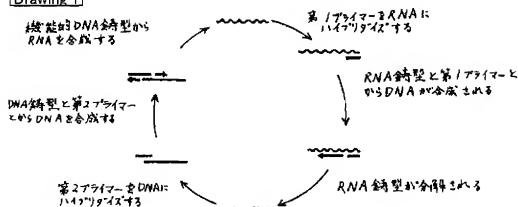
* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

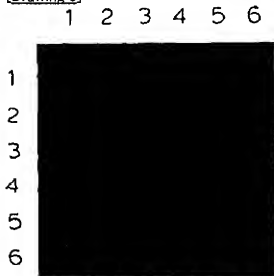
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]



[Drawing 5]



[Drawing 2]

A

T7H1.GAG
 AATTCTAATACGACTCACATATAGGGAGACAATAGGCCCTGCATGCACTGGATGTACTCTATCCCAT

 GAT TATGCTGAGTGATA¹CCCTCTGT TATC¹CGGGACGTACGTGACC TACATGAGATAGGGTA
 T74.PRO

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAACATTTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTC GAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAT T G TAAACG TACC GACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)

124

B

H1.GAG
 GGGAGACAATAGGCCCTGCATGCACTGGATGTACTCTATCCCAT

 CCCCTCTGT TATC¹CGGGACGTACGTGACC TACATGAGATAGGGTA

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAACATTTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTC GAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAT T G TAAACG TACC GACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)

124

[Drawing 3]

0 1 2 3 4



[Drawing 4]

1 2 3 4 5 6 7 8



[Drawing 6]

0 1 2 3 4 5 6 11 12



[Translation done.]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2650159号

(45) 発行日 平成9年(1997)9月5日

(24) 登録日 平成9年(1997)5月16日

(5) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	P I	特許表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	Z.N.A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z.N.A.A

請求項の数33(全 15 頁)

(21) 出願番号	特開平1-14034	(73) 特許権者	980909989 アクソ・ノベル・エス・ベー オランダ国、6824・ベー・エム・アーネ ム、フェルベルウエヒ・76
(22) 出願日	平成1年(1989)1月24日	(72) 発明者	ローレンス・テイー・マレク カナダ国、エル・6・ブイ・4・エイ・ 5、オンタリオ、ブランプトン、スプラ ウル・ドライブ・4
(65) 公開番号	特開平2-5864	(72) 発明者	デエリル・ダベイ カナダ国、エム・6・エヌ・1・エム・ 4、オンタリオ、トロント、デインニツ ク・クレセント・175
(43) 公開日	平成2年(1990)1月10日	(74) 代理人	弁護士 川口 義雄 (外3名)
(31) 優先権主張番号	5 5 9、7 0 9	審査官	平田 新男
(32) 優先日	1989年2月24日		
(33) 優先権主張国	カナダ (C.A.)		
(31) 優先権主張番号	2 1 1、3 8 4		
(32) 優先日	1989年7月24日		
(33) 優先権主張国	米国 (U.S.)		
早期審査対象出願			

(54) 【発明の名称】 核酸増幅方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料を断片化することなく比較的に一定した温度で特定の核酸配列を増幅するための方法であつて、

- (A) (i) 第1のオリゴヌクレオチドプライマー、
 (ii) RNAポリメラーゼプロモーターのアンチセンス配列を含む第2のオリゴヌクレオチドプライマー
 (iii) 前記プロモーターを認識するDNA依存性RNAポリメラーゼ、
 (iv) RNA依存性DNAポリメラーゼ、
 (v) DNA依存性DNAポリメラーゼ、
 (vi) 一重鎖または二重鎖のRNAまたはDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ、および
 (vii) リボヌクレオキシドトリホスフェートおよび/

2

オリゴヌクレオキシドトリホスフェート

を含む一組の反応混合物を用意し、

(B) 前記特定核酸配列またはこの特定核酸配列と相補的な配列を含むRNA第一特異性からなるRNAを、増幅反応サイクルが生起するような条件下で、前記反応混合物中に提供し、しかる後、

(C) 前記特定核酸配列の新設の増幅を達成するのに充分な時間前記条件を維持するステップからなる方法。

【請求項2】 前記RNA第一特異性が前記特定核酸配列を含んでおり、ステップ(B)が前記反応混合物中に一重鎖RNAを提供することを含んでおり、その結果、

(i) 前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーが前記一重鎖RNAとハイブリダイズし、

(ii) 前記RNA依存性DNAポリメラーゼが前記一重鎖RNAを鋳型として利用して前記第1オリゴヌクレオチドプ

3

イマーを伸長することによってDNA第二鎖型を合成し、それによりRNA-DNAハイブリッドを形成し、

(iii) 前記リボヌクレアーゼが、前記RNA-DNAハイブリッドを構成しているRNAを加水分解し、

(iv) 前記第2オリゴヌクレオチドプライマーが前記DNA第二鎖型とハイブリダイズし、

(v) 前記DNA依存性DNAポリメラーゼが前記第2オリゴヌクレオチドプライマーを鋳型として利用して前記DNA第二鎖型を伸長することによって機能性のRNAポリメラーゼプロモーターを合成し、

(vi) 前記DNA依存性RNAポリメラーゼが前記機能性プロモーターを認識し、かつ前記DNA第二鎖型を転写し、それにより前記RNA第一鎖型のコピーを生成させることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記第2オリゴヌクレオチドプライマーがさらに前記DNA依存性RNAポリメラーゼに対する転写開始部位のアンチセンス配列を含んでおり、前記転写開始部位の前記アンチセンス配列が前記RNAポリメラーゼプロモーターの前記アンチセンス配列と機能可能のように結合していることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼであり、転写開始部位の前記アンチセンス配列及び機能性RNAポリメラーゼプロモーターの前記アンチセンス配列が一緒になって次のヌクレオチド配列

ATTCTAATACGACTCATATACGGAG

を構成することとを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】 ステップ(B)がさらに前記反応媒質にサンプルを添加することを含んでおり、その際の条件は、前記特定核酸配列またはこの特定核酸配列と相補的な配列を含むRNA第一鎖型からなるRNAが前記サンプルによって提供された場合に前記サイクルが生起するような条件とすること、および、ステップ(C)の後にさらに前記試薬(i)、(ii)および(vii)のいずれかの消費または前記サイクルの産物の蓄積を、前記特定核酸配列およびそれと相補的な前記配列が存在しない場合の前記反応媒質中における前記試薬の消費または前記産物の蓄積に相当する値と比較することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項6】 ステップ(D)が前記サイクルの核酸産物を検出することを含む請求項4に記載の方法

【請求項7】 ステップ(D)が核酸アッセイを使用して前記核酸産物を検出することを含む請求項5に記載の方法。

【請求項8】 ステップ(D)が制限エンドヌクレアーゼと電気泳動分離を使用して前記核酸産物を検出することを含む請求項5に記載の方法。

【請求項9】 ステップ(D)が前記RNA第一鎖型の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。

【請求項10】 ステップ(D)が前記DNA第二鎖型の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。

【請求項11】 ステップ(D)が機能性のRNAポリメ

4

ーゼプロモーターを含有するDNAをモニターすることを含む請求項5に記載の方法。

【請求項12】 ステップ(D)が前記RNA-DNAハイブリッド中間体の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。

【請求項13】 ステップ(D)がさらに、前記試薬(i)、(ii)および(vii)のいずれかの消費または前記サイクルの産物の蓄積を、前記特定核酸配列およびそれと相補的な前記配列が存在しない場合の前記反応媒質中における前記試薬の消費または前記産物の蓄積に相当する値と比較することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項14】 前記リボヌクレアーゼが大腸菌リボヌクレアーゼHおよびトリ骨髄芽球症ウイルスポリメラーゼのリボヌクレアーゼHからなることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記リボヌクレアーゼが子ウシ胸腺リボヌクレアーゼHであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記第1オリゴヌクレオチドプライマーまたは前記第2オリゴヌクレオチドプライマーが、固定化された支持体と可逆的に結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼである請求項16に記載の方法。

【請求項19】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT3 RNAポリメラーゼである請求項16に記載の方法。

【請求項20】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージφ II RNAポリメラーゼである請求項16に記載の方法。

【請求項21】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがサルモネラバクテリオファージsp6 RNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項22】 前記DNA依存性RNAポリメラーゼがPseudomonasバクテリオファージφ1 RNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項23】 前記RNA依存性DNAポリメラーゼがレトロウイルスリバーstransスクリプターゼであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項24】 前記レトロウイルスリバーstransスクリプターゼがトリ骨髄芽球症ウイルスポリメラーゼであることを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項25】 前記レトロウイルスリバーstransスクリプターゼがモロニー(Mooney)マウス白血病ウイルスポリメラーゼであることを特徴とする請求項22に記載

の方法。

【請求項26】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ活性をもたないことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項27】前記反応試薬中のDNAポリメラーゼがいずれもDNAエキソヌクレアーゼ活性もDNAエンドヌクレアーゼ活性ももたない、請求項1に記載の方法。

【請求項28】前記DNA依存性DNAポリメラーゼがトリ骨髄芽球症ウイルスポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項29】前記DNA依存性DNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ α またはDNAポリメラーゼ β である請求項1に記載の方法。

【請求項30】前記DNA依存性DNAポリメラーゼが子ウシ痘ウイルスポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項31】ステップ(C)が前記条件を30分～4時間維持することからなる、請求項1に記載の方法。

【請求項32】さらに、前記サイクルのDNA産物をクロニングベクターに結合した後前記DNA産物をクローン化するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項33】さらに、前記サイクルの前記DNA産物がコードしている産物を発現系で発現させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、特定核酸配列の増幅方法に係る。

発明の背景

標本中に存在する特定の核酸配列を検出するために核酸の相補的配列で標本をプローブすることは公知の診断方法で使用されている。核酸と相補的核酸との結合は高度に特異的であり、従って標本中に特定の核酸が存在するか否かを有効に判定し得る。このためには、検出すべき特定核酸配列が既知であり該特定配列に相補的な核酸配列をもつプローブを構築することが必要である。

本願において、「特定核酸配列」なる用語は、増幅させるべき一重鎖または二重鎖の核酸を意味する。「標本」なる用語は、複数の核酸を含有する混合物を意味する。「十分に相補的な」なる用語は、2つの核酸即ちプライマーと鋳型とが特異的に相互作用でき所与のイオン強度条件及び温度条件下にプライマー依存性で鋳型依存性のDNA合成を有効に行うことを意味する。

核酸プローブは高度に特異的であるため、いくつかの場合には、核酸配列によって産生されるタンパク質よりもむしろ核酸配列自体をプローブするほうが好ましい。例えば、タンパク質検出だけに基く診断方法では、B型肝炎ウイルスの感染性粒子の存在に関して信頼できる診断を下すことができない。その理由は、DNAゲノムの欠した非感染性抗原粒子が有意レベルで存在するからである。別の例では、前癌性または良性的子宮頸部腫瘍中に検出されるヒト乳頭腫ウイルスの種々のサブタイプ

は核酸プローブハイブリダイゼーションを使用したときにのみ識別できる。またエイズの微生物学的研究からも、エイズ特異的核酸配列の存在に基づくアッセイが最も良の診断方法であることが確認された。

既存の核酸プローブ技術の使用に伴う最大の困難及び既存のプローブ技術の実用性に限界がある理由は、コピー数の問題にある。例えば、1つのウイルスまたは細胞中に通常は特定遺伝子の単一コピー(single copy)が存在する。この1つのコピーがRNAまたはタンパク質のごとき遺伝子産物のコピーを多数生成し得る。このため、検出すべき核酸の特定配列がタンパク質の数千ものコピーを生じ得るので、診断方法においてはタンパク質をプローブする技術がしばしば使用されてきた。

レジオネラ(Legionella)及びマイコプラズマ(Mycoplasma)のごときある種の細菌性病原体の診断を核酸プローブを用いて容易に行うために、細胞当たり100,000コピーにのぼる多数の天然リボソームRNAが遺伝子プローブ(GenProbe)法によって使用されてきた。しかしながら、この戦略は、ウイルスのごとき非細胞性病原体には使用できない。核酸プローブを用いたエイズウイルス検出方法の開発ではコピー数が特に問題になる。何故ならこの場合、組み込まれたプロウイルスは10,000個の末梢血リンパ球のうち1個未満のリンパ球中に存在し得るからである。従って、標本中に存在すると予想される特定核酸配列を増幅できれば、コピー数の問題が解決されプローブアッセイをより容易に使用できる。

少数の細胞しか含まず従って特定遺伝子の少数コピーしか含まない正常生物標本においては、コピー数の問題を解決するために増幅方法を利用する必要がある。

1つの増幅方法は、標本の「十分な増幅」を行なうこと、即ち標本中に存在する生きた生物物質が自然に複製できるように条件を整えることである。核酸配列の量を複製によって検出可能レベルまで増加させる。例えば食品産業では、加工食品の有害細菌Salmonellaを検査するために、食品標本を何日間もインキュベートして核酸量を増加させる必要がある。臨床標本では、病原体の数を増加させるために標本をかなりの期間にわたって増幅させる必要がある。

1987年7月28日付けCetus Corporationの米国特許第4,683,195号及び1987年7月28日付けのCetus Corporationの米国特許第4,683,202号は、標本中に含まれる特定の核酸配列の増幅方法を開示している。米国特許第4,683,195号に記載された方法は、標的核酸配列を含有すると予想される標本をオリゴヌクレオチドプライマーで処理してプライマー伸長産物を合成し、該産物を鋳型として標的核酸配列を増幅させる方法である。好適実施例では熱変性を用いてプライマー伸長産物を鋳型から分離している。また、米国特許第4,683,202号に記載の方法は、異なる2つの相補鎖をもつ標的核酸配列の増幅方法である。この方法では、鎖をプライマーで処理

7

して伸長産物を合成し、プライマー伸長産物を鋳型から分離し、次にプライマー伸長産物を鋳型として使用する。

前出の2つの米国特許はいずれも、増幅方法においてユーザーが手動的または機械的に介入しかつ多段階操作を行わなければならない。これらの特許に含まれる操作段階では、ユーザーが標本を加熱し、冷却し、適当な酸素を添加し、次いで前段階を繰り返す必要がある。温度変化は酵素を失活させる。従ってユーザーは増幅過程の際に適当な酵素のアリコートを増幅混合物に繰り返し補充する必要がある。

米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号によれば更に、増幅方法の各サイクルでは第1鋳型から第2鋳型が合成され、次に第2鋳型を用いて第1鋳型が合成される。このようにしてこの手順が繰り返されるが、増幅方法の各サイクルは1つの基質から1つの産物の合成に基いている。

従来技術に開示された増幅方法にかかわらず、増幅方法の改良が必要とされている。ユーザーの介入が少なく操作が少ない増幅方法が好ましい。更に、増幅方法に關する酵素の活性に影響を与えないように増幅が比較的一定の室温で行なわれるのが有利である。増幅方法の各サイクル毎に1つの鋳型を使用して1つの基質から2つ以上の産物を生成することができれば更に好都合であろう。

発明の概要

本発明は、ユーザーによる介入及び操作が従来の増幅方法より少ない有利な増幅方法に係る。増幅が比較的一定の室温で行なわれる。更に、この方法の各サイクルでは1つの基質からその産物の複数コピーが産生される。本発明の増幅方法は、特定核酸の量を増加させこれによりコピー数の問題を解決するために使用され得る。従って、プローブアッセイの使用がより容易になる。また、特定核酸配列の純度を向上させるために本発明の増幅方法を従来のクローニング方法に代替して使用することも可能である。

本発明の1つの態様に従って特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法は、一重鎖RNA、一重鎖DNA及び二重鎖DNAの合成を含む。一重鎖RNAは第1プライマー用第1鋳型である。一重鎖DNAは第2プライマー用第2鋳型である。二重鎖DNAは第1鋳型の複数コピーを合成用第3鋳型である。第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的である。第1プライマーの3'の末端は相補鎖上の第2プライマーの3'の末端に向けて方向付けされている。

本発明の別の態様に従って特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法は以下の段階を含む。

(a) 第1プライマーを第1鋳型にハイブリダイズ

8

る。第1プライマーは第1鋳型のRNA配列に十分に相補的なDNA配列をもつ。

(b) 第1プライマーに共有結合し第1鋳型のRNA配列に相補的な第2DNAを合成する。第3DNA配列及び第1プライマーが第2鋳型を構成する。

(c) 第2プライマーのハイブリダイゼーションを行なわせるために第1鋳型を第2鋳型から分離する。

(d) 第2プライマーを第2鋳型にハイブリダイズする。第2プライマーは第2鋳型のDNA配列に十分に相補的なDNA配列をもつ。第2プライマーはまたRNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列をもつ。

(e) 第2プライマーに共有結合し第2鋳型のDNA配列に相補的な第2DNA配列を合成し、第2鋳型に共有結合し第2プライマーのDNA配列に相補的な第3DNA配列を合成する。第2及び第3のDNA配列及び第2プライマー-第2鋳型が第3鋳型を構成する。

(f) 第3鋳型から第1鋳型のRNA配列の複数コピーを合成する。

20 第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列に十分に相補的であり、第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

本発明の別の方法では、第2プライマー-DNAが第2鋳型のDNA配列に十分に相補的な配列を3'末端にもつ。第2プライマーは5'末端にRNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列をもつ。

30 本発明の更に別の方法では、第2鋳型に共有結合した第3DNA配列は第2プライマーの5'末端のDNA配列に相補的である。

本発明の別の方法においても特定核酸配列の増幅方法が使用される。該方法では、第1プライマーと第2プライマーとリボスクレアーゼHとRNA依存性DNAポリメラーゼとDNA依存性DNAポリメラーゼとRNAポリメラーゼとリボスクレオシド三リン酸とデオキシリボスクレオシド三リン酸とを標本と混合する。第1プライマー-DNAは第1鋳型RNAに十分に相補的な配列をもつ。第2プライマー-DNAは、RNAポリメラーゼによって基質として認識される第2鋳型DNAに十分に相補的な配列とプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列をもつ。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は、特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

本発明の更に別の方法においても特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法では、第1プライマーと第

50

2プライマーとトリヌクレオチドポリヌクレオチドと大腸菌リボヌクレアーゼHとバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼとリボヌクレオシド三リン酸とデオキシポリヌクレオシド三リン酸とを概本に添加する。第1プライマー-DNAは第1鋳型RNAに十分に相補的な配列をもつ。第2プライマー-DNAはT7 RNAポリメラーゼによって基質として認識される第2鋳型DNAに十分に相補的な配列とプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列を含む。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

具体例

本発明は特定核酸配列の増幅方法に係る。増幅はDNA及びRNAの交互合成を含み第1図に概略的に示されている。この方法においては、一重鎖RNAが一重鎖DNAに変換され、該一重鎖DNAが二重鎖RNAの複製コピー合成用の機能性鋳型に変換される。第1プライマー及び第2プライマーが増幅方法で使用される。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的である。いくつかの場合、例えば特定核酸配列が二重鎖DNAの場合には、第1プライマーと第2プライマーとの双方が特定核酸配列の配列に十分に相補的かつ十分に相補的である。

RNAオリゴヌクレオチドプライマー（第1プライマー）をRNA（第1鋳型）にハイブリダイスさせRNA依存性DNAポリメラーゼを用いて第1プライマーから相補鎖DNA（第1DNA配列）を合成することによって一重鎖DNAに変換される。例えば第1鋳型の加水分解とRNA-DNAハイブリッドに特異的なリボヌクレアーゼ（例えばリボヌクレアーゼH）を使用し、得られた一重鎖DNA（第2鋳型）を第1鋳型から分離する。第2鋳型はRNA合成可能な形態に変換される。この変換は、第2鋳型の3'末端に十分に相補的な配列を3'末端に含む5'末端に向かってプロモーターのアンチセンス鎖と転写開始部位のアンチセンス配列を含む配列をもつ合成オリゴヌクレオチド（第2プライマー）をハイブリダイスし、第2鋳型を鋳型として用いて第2プライマーの3'末端に共有結合した第2DNA配列を合成し、DNA依存性DNAポリメラーゼを用いて第2プライマーを鋳型として用いて第2鋳型の3'末端に共有結合した第3DNA配列を合成することによって行なわれる。得られた第2鋳型の機能性鋳型が第3鋳型であり、これを使用し、第2プライマーによって規定されるプロモーター及び転写開始部位に特異的なRNAポリメラーゼを用いて第1鋳型であるRNAの複製コピーを合成する。サイクルを繰り返すことによって、新しく合成された第1鋳型の各々が更に第2鋳型及び第3鋳型のコ

ピーに変換され得る。また、サイクルの繰り返しがユーザーの介入または操作を要しない。

増幅方法は、適当な反応条件下に適当な酵素、プライマー及び補因子に適当な鋳型核酸を添加することによって開始される。この鋳型核酸は、均質で連続的な増幅が可能な形態であり、第1図に示すサイクルにおける中間体として機能する。増幅方法では前駆体（プライマー、リボヌクレオシド三リン酸及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸）の正味（net）の消費及び産生物（RNA及びDNA）の正味の蓄積が生じる。RNA及びDNAの合成過程は、検出に十分なレベルの核酸が合成されるまで非同時的に進行する。増幅過程は例えば標識前駆体からの標識産物の合成によって追跡される。

増幅が、第1図に概略的に示すプロセスに付加または代替して別のプロセスを含んでもよい。また、ある種の逆産生性（counter productive）酵素反応が許容できる低速度で発生してもよい。予想される非産生性副反応の1つは、鋳型核酸の非存在下のRNA及び/またはDNAの合成である。かかるRNA及び/またはDNA産物を所望産物から識別するためには、特定核酸配列の2つのプライミング部位間のみ検出される特定配列の有無を判定すればよい。

第1プライマーは、第1鋳型の3'末端に十分に相補的な配列を3'末端にもつオリゴデオキシリボヌクレオチドである。第1プライマーの3'末端の配列は、所与のイオン強度条件及び温度条件下に第1DNA配列を特異的に合成するために十分な特定の長さ及び塩基組成をもつ。第1サイクルにおいて第1プライマーは第1鋳型の3'末端の内部の領域に十分に相補的であり得る。その後のサイクルにおいて、第1プライマーの5'末端は第1鋳型の3'末端に相補的である。第1プライマーの一部または全部が天然デオキシリボヌクレオチド以外のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から構成されてもよいと考えられる。第1サイクルで第1プライマーの5'末端は第1鋳型に相補的でない配列を含んでいてもよい。非相補的配列は、固定化可能な核酸に相補的であってもよく、または検出容易なリポーターのごとき有用な非核酸成分と結合可能であってもよい。または、非相補的配列が、プロモーターのアンチセンス配列とRNA合成に使用できる転写開始部位のアンチセンス配列とを含んでいてもよい。このRNAは、第1鋳型に相補的であり別の増幅サイクルで中間体として使用される。

第2プライマーは第2鋳型の3'末端に十分に相補的な配列を3'末端に含むオリゴデオキシリボヌクレオチドである。第2プライマーは所与のイオン強度条件及び温度条件下に第2及び第3のDNA配列を特異的に合成せしめるに十分な特定の長さ及び塩基組成をもつ。更に、第2プライマーは機能性プロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列を含む。この配列は、第3DNA配列の合成用鋳型として使用された

11

とき、RNAポリメラーゼの特異的効率的結合と所望部位での転写開始と行なわせるに十分な情報を含む。プロモーター配列は機能性プロモーターのアンチセンス鎖に由来してもよい。転写開始部位は天然RNA転写物の5'末端配列に由来してもよい。好適実施態様においては、第2プライマーの5'末端配列は、AATCTAATAGGACTACTA TAGGAGである。この配列は、T7 RNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列を含む。または、別のファージRNAポリメラーゼ用の転写開始部位とプロモーターとを使用してもよい。更に、プロモーター機能に関係しない配列が、第2プライマーの5'末端に含まれるかまたは第2鎖型にハイブリダイズする3'末端の配列と転写開始部位との間に含まれていてもよい。第2プライマーの一部または全部が天然デオキシリボヌクレオチド以外のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から構成されてもよい。

本発明で使用する酵素はすべて、いくつかの実用規格を充足させる必要がある。酵素または酵素調製物の各々は、ある種のDNAポリメラーゼ及び/または二重鎖に特異的なエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼにおいてしばしばみられる5'-または3'-のエキソヌクレアーゼ活性のような有害なデオキシリボヌクレアーゼ（「DNase」）活性を有してはならない。酵素または酵素調製物の各々は、RNA及びDNAのハイブリッドに特異的に好適なリボヌクレアーゼ活性（例えばリボヌクレアーゼH）の添加を除いて、有害なリボヌクレアーゼ（「RNase」）活性を有してはならない。更に各酵素は、その他の酵素過程、及びRNAまたはDNA鎖型にオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズするような非酵素過程で用いられる一般的な反応条件下で適当な程度に活性でなければならない。

本発明で用いられるDNA依存性RNAポリメラーゼは、プロモーターと指称される特定DNA配列に結合できかつプロモーターに極めて近接した所定の開始部位でRNAの *in vitro* 合成を特異的に開始し得るいかなる酵素でもよい。プロモーター及び開始部位が第2プライマーの一部を形成する。更に、RNAポリメラーゼは、適当な時間内に鎖型の機能性コピー当たり数個のRNAコピーを合成し得ることが必要である。好適実施態様では、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼが使用される。更に別のバクテリオファージRNAポリメラーゼ、例えばファージ3、ファージφ II、Salmonellaファージsp6またはPseudomonasファージφ-1の使用も可能である。また別の実施態様では、原核細胞または真核細胞DNA依存性RNAポリメラーゼを使用してもよい。別のRNAポリメラーゼを使用する場合には、第2プライマーのプロモーターを配列及び開始配列を特定RNAポリメラーゼの鎖型特異性に従って適宜変更する必要がある。

本発明で用いられるRNA依存性DNA依存性DNAポリメラーゼはオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー及びRN

12

A鎖型からDNAを合成し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は更に、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性及びRNase H活性を含んでもよい。好適実施態様においては、トリ筋芽細胞ウイルスポリメラーゼ（「AM2逆転写酵素」）が使用される。更に、RNA依存性DNAポリメラーゼが別のレトロウイルス、例えばモノネー（Maloney）マウス白血病ウイルスに由来してもよい。または別の真核細胞RNA依存性DNAポリメラーゼを使用してもよい。

本発明で用いられるDNAポリメラーゼは、オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーとDNA鎖型とからDNAを合成し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は多くの種類のDNAポリメラーゼに関連する5'-または3'-エキソヌクレアーゼ活性を有してはならない。好適実施態様ではAM2逆転写酵素が使用されるが、5'-または3'-のエキソヌクレアーゼ活性が本発明にDNA依存性DNAポリメラーゼでも使用できる。このようなポリメラーゼの例は、いくつかの真核細胞DNAポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼαまたはβ、オリゴヌクレオチドと哺乳動物細胞から単離されるDNAポリメラーゼである。普通なら不適当なDNAポリメラーゼも、DNAポリメラーゼ遺伝子の変性と適当な宿主細胞中での変性ポリメラーゼの発現とを駆動するようかまたDNAポリメラーゼタンパク質を化学的に修飾することによって不要なエキソヌクレアーゼ活性を除去すれば有用になる。変性型のDNAポリメラーゼは、大腸菌ポリメラーゼⅠのクレノウ（Klenow）フラグメントから調製されてもまたはバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼから調製されてもよい。好適実施態様においては、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性とDNA依存性DNAポリメラーゼ活性との双方が明記酵素によって与えられるので、前記のごとき変性型のDNA依存性DNAポリメラーゼ活性は、RNA依存性DNAポリメラーゼに起因する活性の補足として付加されることが理解されよう。

本発明で用いられるRNase Hは相補的DNAにアニールされるRNAを加水分解し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は、二重鎖または二重鎖のRNAまたはいかなるDNAも加水分解してはならない。好適実施態様においては、大腸菌RNase Hを使用する。更に別のRNase H酵素、例えばウシ胸腺RNase Hの使用も可能である。RNase HはAM2逆転写酵素の固有活性であるから、好適実施態様では大腸菌RNase H:AM2逆転写酵素のRNase Hが付加される。また第1鎖型から第2鎖型を分離し得る別のいかなる酵素を使用してもよい。

DNA合成及びRNA合成の双方にとって必要な緩衝液及び補因子を入れた反応容器で前記酵素とプライマーとを一緒に混合する。更に当業者が公知のごときDNA及びDNA鎖型にプライマーを特異的にハイブリダイズさせるための適当なイオン条件及び反応温度を与える。反応混合物は、増幅方法を妨害する物質、例えば酵素の活性を大幅に阻害するかプライマーと鎖型とのハイブリダイズを妨

50

13

替するかまたは核酸中間体及び産物を非産生的に分解させる物質を含んではならない。

増幅方法の応用に役立つと思われるいくつかの検出手順を説明する。本増幅方法で合成された核酸の検出手段が可能な手順に限定されないこと、別の検出手法の使用が可能であることが理解されよう。

検出手順の1つの実施態様においては、反応混合物に標識前駆体を添加し得る。当業者に公知の方法を用いて標識前駆体から分離できる標識産物の定量分析または定性分析によって増幅が検出される。

標識前駆体は、RNA合成を検出するリボヌクレオシド三リン酸でもよく、またDNA合成を検出するデオキシヌクレオシド三リン酸またはオリゴヌクレオチドプライマーでもよい。標識のタイプは放射性同位体でもよく、またはビオチンのごとき有用な化学基、発色団、蛍光発色団または抗体に結合し得るハプテンでもよく、またはタンパク質または酵素でもよい。標識産物は溶解度、電荷またはサイズに基づいて標識前駆体から分離されてもよい。更に、標識DNAまたはRNAを、相補配列を含み固定化することが可能な核酸にハイブリダイズしてもよい。

別の実施態様においては、増幅方法の産物が固定化担体に結合され、相補配列を含む核酸プローブにハイブリダイズされ、さらに溶液中に残存する非ハイブリダイズ核酸プローブから分離される。産物となるDNAまたはRNAは、疎水的、静電的または共有相互作用のような安定な相互作用によって固体担体に直接結合されてもよい。更に、産物は、固定化タンパク質（例えばアビジンまたはストレプトアビジン）に結合させること増幅方法では、その産物中に取り込まれ得るビオチンのような種の化学基を含んでもよい。更に産物は、相補配列を含み固定化することが可能な核酸にハイブリダイズされてもよい。核酸プローブは、ハイブリダイゼーション条件下に結合を生じかつ非ハイブリダイズ核酸プローブの除去に使用される条件下で持続的に結合させるために増幅方法の産物と十分に安定な相互作用を形成する相補配列を含む。好適実施態様において、相補配列は第1プライマー配列と第2プライマー配列との間に存在する特定核酸配列の配列部分に由来する。核酸プローブは、一重鎖DNAまたはRNAでもよく、または一重鎖にできる二重鎖DNAまたはRNAでもよく、またはデオキシリボヌクレオチド及び/またはリボヌクレオチドから構成され得るオリゴヌクレオチドでもよい。更に、核酸プローブは、適当な条件下にDNA産物またはRNA産物に共有結合し得る化学基を含んではいてもよい。放射性同位体、ビオチンのごとき有用な化学基、発色団、蛍光発色団または抗体に結合し得るハプテンで核酸プローブを標識してもよい。核酸プローブは更に、タンパク質またはホスファターゼ、ペルオキシダーゼのごとき酵素との複合体を形成し得る。核酸プローブは更にプローブをin vitro複製し得るある種の配列を含んではいてもよい。

14

分子クローニング技術によって進歩した典型的核酸処理方法によって本増幅方法の産物を分析することが可能である。1つの方法では、合成DNAを制限エンドヌクレアーゼで分解し、電気泳動法で分離し、当業者に公知の方法で検出することによって特定DNA配列の合成を検出し得る。別の方法では、RNA依存性DNAポリメラーゼと第1プライマーとジデオキシヌクレオシド三リン酸とを用いたDNA合成によって、増幅RNAの配列を決定し得る（Stofflet等、1988）。更に別の方法では、本増幅方法で使ったDNA依存性RNAポリメラーゼと3'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸とを用いたDNA合成によって増幅された第3鎖型の配列を決定し得る（Axelrod & Kramer, 1985）。別の方法においては増幅RNAがin vitro翻訳され得るポリペプチドをコードするであろう。in vitro翻訳されたポリペプチド産物は抗体を用いて分析され得る。

特定核酸配列を合成すると予想されるかまたは含有することが判明している標本を、均質な連続増幅が可能な鎖型核酸の形態で反応混合物に添加する。この反応混合物は第1図のサイクル中のいかなる中間体でもよい。特に、鎖型核酸は、第2プライマーの3'末端に存在する配列と十分に相同の配列を5'末端に含み、かつ第1プライマーに十分に相補的な配列を含む一重鎖RNAでもよい。この形態の鎖型核酸は本増幅方法では第1鎖型として機能するであろう。または、中型核酸は、第2プライマーの少なくとも3'末端と十分に相補的な配列を3'末端に含みかつ第1プライマーの3'末端に存在する配列に十分に相互の配列を含む一重鎖DNAでもよい。この形態の鎖型核酸は本増幅方法では第2鎖型として機能するであろう。または鎖型核酸は、一方の鎖が5'末端に第2プライマーの完全配列を含みかつ第1プライマーと十分に相補的な配列を含む二重鎖DNAでもよい。二重鎖DNAは本増幅方法では第3鎖型として機能する。

鎖型核酸の複製は本増幅方法の一部を構成しないが、増幅方法の応用に役立つと思われる鎖型核酸形成手順の幾つかの例を以下に説明する。しかしながら鎖型核酸形成手順が記載の種々の手順に限定されることなく別の方法も使用できることは理解されよう。

鎖型核酸形成手順の1つの例においては、第1鎖型として機能し得る鎖型核酸は、天然由来RNAであるかまたは当業者に公知の部位特異的加水分解法（Shibahara等、1987）を用いてより大きいRNA分子から生成され得るRNAフラグメントであり得る。

別の例においては、第2鎖型として機能し得る鎖型核酸は、第2プライマーの3'末端に十分に相補的な配列に直接つながり（flanking）、制限エンドヌクレアーゼで消化し得る部位をもつ二重鎖DNAから調製され得る。

更に別の例においては、第2鎖型として機能し得る鎖型核酸は、DNA合成を阻止し得るオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた一重鎖DNAまたはRNAから調製され

50

15

る。この素子オリゴヌクレオチドは適当な条件下に鋳型に共有結合し得る化学基を含んでもよい。第1プライマーを使用してこの阻止された鋳型からDNAを合成すると第2鋳型と同じ3'末端をもつ合成DNAが得られる。出発鋳型がRNAのとき、得られるDNA-RNAハイブリッドは鋳型核酸として直接使用され得る。出発鋳型がDNAのとき、得られた第2鋳型のコピーは化学的または熱的変性方法によって出発鋳型から分離される。

別の例においては、第3鋳型として機能する鋳型核酸は、第2プライマーを用いてDNAまたはRNA鋳型からDNA合成された一重鎖DNAまたはRNAから調製される。得られた合成DNAを化学的または熱的変性方法を用いて出発鋳型から分離する。更に、化学的または酵素的方法を用いてRNA鋳型を加水分解する。得られた一重鎖DNAは5'末端に共有結合した第2プライマーの配列をもつ第1プライマーに十分に相補的は配列を含む。一重鎖DNAに第1プライマーをハイブリダイズし、さらに第1プライマーに共有結合しかつて一重鎖DNAに相補的なDNA配列を合成することによって、この一重鎖DNAを転写機能をもつ二重鎖DNAに変換し得る。

さら別の例においては、化学的、熱的または任意に酵素的方法を用いて二重鎖DNA、二重鎖RNAまたはDNA-RNAハイブリッドから一重鎖DNAまたはRNA鋳型を得ることができる。次に、前述の鋳型核酸形成手順のいずれかを用い、得られた一重鎖DNAまたはRNAから第1、第2または第3の鋳型として機能する鋳型核酸を生成する。また、第1プライマー及び核酸の一方の鎖が関与する手順と第2プライマー及び核酸の他方の（相補）鎖が関与する別の手順とを同時に使用して鋳型核酸を調製することも可能である。

材料及び方法

材料

Applied Biosystems 380A DNAシンセサイザーを使用してオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチド合成に使用したカラム、ホスフォラジクト（phosphoramidites）及び試薬はTechnical Marketing Associatesを介してApplied Biosystems, Inc.から入手した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びDEAEセロースロマトグラフィーを順次用いてオリゴヌクレオチドを精製した。放射性同位体 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP (800Ci/mmol) はAmershamから入手した。DNAを分離及び結合させる酵素はNew England Biolabsから購入した製造業者の使用説明書通りに使用した。DNAポリメラーゼ1 (Klenow) の大フラグメントを含む調製物はNew England Biolabsから購入した。RNasin及びT7 RNAポリメラーゼはBio/Can Scientific Inc.を介してPromega Biotechから購入した。逆転写酵素及びRNase HはPharmaciaから入手した。プロテイナーゼKはBoehringer Mannheim Canadaから入手した。すべての物質転換は大腸菌HB101株 (ATCC33694) を使用した。プラスミドpUC19 (Norrander等, 1983) はBethesda Research Laboratoriesから購入した。

16

de Research Laboratoriesから購入した。

DNAの単離及び配列決定

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むYT培地 (Miller, 1972) で大腸菌形質転換媒体を増殖させた。高速沸騰法 (Hollmes & Quigley, 1981) によってプラスミドDNAを精製した。すべての構築に使用したDNAフラグメント及びベクターを低沸点アガロース電気泳動で分離し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって溶解アガロースから精製した (Maniatis等, 1982)。ジデオキシ法 (Sanger等, 1977) の修正方法 (Hartori等, 1985) を用いてプラスミドDNA配列決定した。反応開始のために-20ユニバーサルプライマー (New England Biolabs) を使用した。

TCA沈殿

増幅反応のアリコート (5 μM) 20 μM の10mM EDTA中で制止し、一定時間おきのすべての標本の収集が終わるまで氷上に維持した。次に制止された標本をガラスフィルターディスクに塗布し、直ちに氷冷5%トリクロロ酢酸 (TCA) - 1%のピロリン酸ナトリウム中に浸し込み、10分間ときどき攪拌した。次に氷冷5%TCAで5分間ずつ2回洗浄し、95%エタノールで更に2回洗浄し、凍結によって乾固した。液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動

標本 (1-8 μM) を4-5 μM のホルムアミド染料 (90%脱イオンホルムアミド、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、キシレンシアノール及びプロモフェノールブルー) と混合し、電圧印加前 (pre-run) の12cm長さの7%変性ポリアクリルアミドゲルに塗布した。プロモフェノールブルー染料が底部に到達するまでゲルに350ボルトを印加した。いくつかの場合にはオートラジオグラフィーにかけ前にゲルを固定しかつ乾燥した。固定は10%メタノール-7%酢酸中で15分間洗浄して行った。この方法で分離されたRNA産物のプロファイルはオートラジオグラフィーによって室温で可視化した。

実施例1

gaq試験系用オリゴヌクレオチドの設計及び合成
EcoR I部位と、T7ファージプロモーターと、T7 RNAポリメラーゼによる転写開始に必要な配列と、18bpのハイブリダイゼーション領域 (ハイブリダイゼーション領域1) とを含むように合成DNA配列を設計した (第2A図)。これらの構成要素のクロニングに關与する47bのアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖 (T7HLCAC) は第1プライマーとしても機能する。ハイブリダイゼーション領域2はハイブリダイゼーション領域1から53bpを隔てており長さ20bpである。この領域 (H2_GAC) に対して形成されるプライマーは20bのセンスオリゴヌクレオチド鎖の重複でありクロニングには使用されない。ハイブリダイゼーション領域全体を含む配列はエイズの原因物質であるHIV-IIIゲノムのgaq部分の92bpのセグメン

50

トである。この特定遺伝子セグメントを選択した理由は、プライマーが有効にハイブリダイズすると予想されたこと及び2つのハイブリダイゼーション領域間に間隔が比較的短いことにある。更に、クロニングを容易にするために配列の末端にXba I部位を配置した。qac試験配列はまた、組換え体のスクリーニングを容易にするSal I部位及びPst I部位を含む。

このフラグメントのクロニングにおいては合計4つのオリゴヌクレオチドを使用した。qac試験配列及びqac試験配列の構築に使用したN1.GAGはアンチセンス鎖を完成させクロニング過程でのみ使用される。また、T7 4. PROはT7プロモーターのセンス鎖成分である。しかしながら、N2.GAGは双方の試験フラグメントの構築に使用され、また増幅サイクルの2つの段階の中間体(第2鋳型)として使用された。完全にクロニングされたqac試験フラグメントはまた、増幅サイクルの中間体(第3鋳型)を構成し得る。適当なベクター中でクロニングされるとqac試験DNAはT7 RNAポリメラーゼによって転写され、3つの段階に關与する増幅中間体として有用なRNAフラグメント(第1鋳型)を産生する。更にT7H1.GAG及びH2.GAGは試験系のプライマーとしても機能する。

qac試験合成DNAフラグメント(第2鋳型)はT7プロモーターを含みながら配列の残りの部分はqac試験配列と同じであり、従ってN1.GAG及び2.GAGの双方がその構築に關与した。アンチセンス鎖の完成に必要なオリゴヌクレオチドをH1.GAGと指称する。一旦クロニングされると、qac試験フラグメントはDNA制限フラグメントを鋳型核酸として用いながら増幅を試験する鋳型として使用できる。

実施例2

qac試験プラスミドの構築

70mMのTris HCl (pH7.6)と10mMのMgCl₂と5mMのDTTと0.5mMのATPと5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼとを含む20μlの反応物中でオリゴヌクレオチドT74.PRO及びN1.GAG(各2μg)を別々に37°Cで30分間リン酸化した。リン酸化したT74.PRO及びN1.GAG(各10μg)を各1μgの非リン酸化T7H1.GAG及びN2.GAGと3μgの100mMのTris HCl (pH7.8) - 500mMのNaClと混合しqac試験アセンブリ用の最終容量29μlにした。qac試験混合物は10μlのリン酸化N1.GAGと各1μgの非リン酸化H1.GAG及びH2.GAGと1.8μgの100mMのTris HCl (pH7.8) - 500mMのNaClとを最終容量18μlの中に含んでいた。90°Cで10分間維持し10~16時間ゆっくりと室温まで放冷することによってオリゴヌクレオチド混合物を別々にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを結合するために50mMのTris HCl (pH7.8)と10mMのMgCl₂と20mMのDTTと3mMのATPと50μg/mlのBSAを含む60μlの反応物を使用した。qac試験反応物は400単位のT4 DNAリガーゼを添加し15°Cで2時間インキュベートした。qac試験反応物は200単位のT4 DNAリガーゼと共に1

4~16時間インキュベートした。

ポリリンカー領域内部の制限酵素部位で切断することによって直線化しておいたプラスミドpUC19と単離し精製した合成DNAセグメントを混合した。T4 DNAリガーゼを使用してqac試験配列をpUC19のEcoR I-Xba Iフラグメントに結合した。またqac試験配列をSma I-Xba Iフラグメントに結合した。これらの反応後に得られた形質転換体由来のプラスミドDNAを使用して大腸菌を形質転換し、制限分析によってスクリーニングし、配列解析によって最終プラスミド(pGAG.TEST及びpGAG2.TEST)が正しいことを決定した。

実施例3

RNA増幅に対するプライマー濃度の影響

qac試験オリゴヌクレオチドから転写されたRNAを増幅するために使用された反応混合物(25μl)は50mMのTris HCl (pH8.45)と6mMのMgCl₂と40mMのKClと10mMのジチオスレイトールと0.5mMのNTP(ATP,CTP,GTP,UTP)と1mMのdNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)と20単位のRNasinと100単位のT7 RNAポリメラーゼと100単位のT7 RNAポリメラーゼT10単位の逆転写酵素と0.4単位のRNase Hと10μlの[α-32P] UTPと含有していた。2つの反応物は0.5nq(0.015pmol/l)のN2.GAGを含み、一方他の2つの反応物は鋳型を含んでいなかった。プライマーT7H1.GAG及びH2.GAGの各々を最終濃度3.4μMまたは0.3μMでN2.GAG含有または鋳型非含有の反応物に添加した。反応物を42°Cで2時間インキュベートした。30分毎にTCA不溶cpmの取込みを測定することによってRNA総合成量をモニタした。鋳型依存性RNA合成に対するプライマー濃度の影響を表1に示す。等量の合成RNAを含有する各反応のライコートをPAGE及びオートラジオグラフィーによって分析した(第3図、反応と同じ番号レーン1~4)。

反応	各プライマー濃度(μM)	N2.GAGからの28時間後のRNA増幅	
		鋳型(nq)	合成RNA(μg)
1	3.4	0.5	2.8
2	3.4	—	2.1
3	0.34	0.5	1.8
4	0.34	—	0.7

反応1は最大量の同位体取込みを示したが、対照鋳型である反応2も高い取込み率(反応1の73%)を示し、極めて類似した電気泳動プロフィールを示した。従って、高濃度プライマー存在中の増幅においては鋳型が全く存在しなくても、予想されたサイズと等しいサイズのRNA転写物が産生される。1/10のプライマー濃度の濃本を使用して得られた結果は顕著な違いを示した。反応3で産生されたRNAの量は反応4の2.6倍であるが、反応3においては質実的に全部の転写物が予想されたサイズの単一バンド中に検出され、反応4においては60~70%を上回るフラグメントは検出されなかった。従ってプライマー

濃度はRNA増幅の正確度及び効率に重要な役割を果たす。

増幅系による産物が予想されるフラグメントのサイズを示すために試験プラスミドからの転写によって対照RNA転写物を調製した(第3図のレーン0)。pGAG-TESTをXba Iで切断して直線化し、プロテインアーゼKで処理し(Manias等, 1982)、フェノール抽出し、エタノール沈殿した。次にT7 RNAポリメラーゼを製造業者の使用説明書通りに使用し、0.5 μ gの得られたフラグメントを10 μ g α -[α -32P] UTPを含有する25 μ lの反応混合物中で転写した。

実施例4

RNA増幅に対する鋳型濃度の影響

qac試験オリゴヌクレオチドから転写されたRNAを増幅するために使用された50 μ lの標準反応混合物は、0.34 μ MのT7H1.GAGと0.34 μ MのH2.GAGと50 μ MのT7H1.HCT (pH 4.5)と6mMのMgCl₂と40mMのKClと10mMのDTTと0.5mMのNTPと40mMのdNTPと40単位のRNase Hと20単位のT7 RNAポリメラーゼと20単位の逆転写酵素と0.8単位のRNase Hと10 \sim 20 μ g α -[α -32P] UTPを含有し、1ngから1fgの鋳型の種々の量の鋳型(N2.GAG)を含有し、1つの反応は鋳型を含有しない。反応を42°Cで3時間インキュベートし、インキュベーションの開始から30分毎にTCA不溶成分の取込みを測定することによってRNA結合量モニタした。表IIに示すように、RNA結合量は鋳型のすべての被検液において鋳型非含有の対照より多い。RNA結合量は鋳型濃度の低下に伴って減少する。の減少は定量的ではない。出発鋳型当たりのRNAの増幅度は一般に、鋳型濃度が低いほど大きい。1fgのN2.GAG鋳型から0.8 μ gのRNAが合成されると8 $\times 10^4$ 倍の増幅度が得られたことになる。1fgの102-b N2.GAGオリゴヌクレオチドは約2 $\times 10^4$ 分子を示す。

表II

N2.GAGからの3時間後のRNA増幅				
反応	鋳型	合成RNA (μ g)	増幅倍率	
1	1ng	3.5	3.5×10^4	
2	100pg	4.4	4.4×10^4	
3	10pg	4.1	4.1×10^4	
4	1pg	3.0	3.0×10^4	
5	100fg	2.7	2.7×10^4	
6	10fg	1.9	1.9×10^4	
7	1fg	0.78	7.8×10^4	
8	—	0.046	—	

反応3時間後に合成されたRNAを各鋳型濃度毎にPAGEで分析した(第4図、反応と同じ番号のレーン1 \sim 8)。約100bのRNAを示す主要バンドが鋳型1fg含有及び鋳型非含有の反応を除く全ての反応に存在していた。1fgの鋳型を含有する反応では3時間100bの産物を多量に含んでいなかったが、RNA結合量は鋳型非含有反応より多く定性的な違いを示した。

実施例5

RNA産物のハイブリダイゼーション分析

実施例4の手順の放射性標識UTPだけを削除して1pg \sim 0.1fgの範囲の種々の量のN2.GAG鋳型を含有する増幅反応を行なった。反応を42°Cで2時間インキュベートした。30分毎に各反応からアリコートを取り出しナイロン膜(Amersham)に塗布した。これらの反応アリコートに含まれていた核酸を紫外線照射によって固定した。最終濃度50%v/vのホルムアミドと5 \times SSCと5 \times Denhardt溶液(Mania-tis等1982;Southern等, 1975)とから成り100 μ l当たり5mMに等しい量のプレハイブリダイゼーション緩衝液中で膜を50°Cで1時間プレハイブリダイズし、さらに比活性10⁶cpm/mlの放射性標識プローブのハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイズした。50%のホルムアミド、5 \times SSC及び5 \times Denhardt溶液(Mania-tis等, 1982;Southern等, 1975)中でハイブリダイゼーションを50°Cで1時間行なった。放射性標識プローブは、T4ポリヌクレオチドキナーゼと(α -32P) ATPを用いて5'末端を標識した合成オリゴヌクレオチド5' GATCTGGATGACAGTACATCCGであった。次に、2 \times SSCと0.1%v/v SDS及び0.2 \times SSCと0.1%v/v SDSから成る洗浄液を用い(Southern等, 1975;Maniasis等, 1982;Sostak等, 1979)、50°Cで最低2、3回以上は連続して膜を洗浄した。

第5図は異なるインキュベーション時間で採取された種々の量のN2.GAG鋳型を含有する増幅反応で得られたハイブリダイゼーション分析の結果を示す。

第5図の縦の線の各々は異なる時点を示し(1は30分、2は60分、3は90分、4は120分、5は150分、6は180分)、横の線の各々N2.GAG鋳型の種々の添加量を示す(1は1pg、2は100fg、3は10fg、4は1fg、5は0.1fg、6は鋳型非添加)。行1 \sim 3(1pg \sim 10fg)において標識プローブにハイブリダイズした核酸の増幅が観察されたが、行4及び5(1fg及び0.1fg)においては特定核酸に対するハイブリダイゼーション行6(鋳型非含有)より盛んではなかった。行6の標識プローブの見掛けの非特異的結合はDNAまたはRNA合成に関連すると推定される。その理由はハイブリダイゼーションシグナルが経時的に増加するからである。

実施例6

鋳型としてのDNA制限フラグメントの使用

プラスミドpGAG-TESTをMsp Iで切断し、プロテインアーゼKで処理し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製し、5分間沸騰させて変性した。N2.GAGオリゴヌクレオチドの代わりにMsp I分解したpGAG-TESTを鋳型として使用する以外は実施例4と同じ手順で増幅反応を行い分析した。各反応に対するプラスミドの添加量は55ng \sim 5.5pgの範囲であり、1つの反応には鋳型を添加しなかった。実際の標本中に存在するはずの付加的DN Aをシミュレートするために、同様に切断し精製し変性

21

した1ngの子ウシ胸腺DNAを含む別の反応も用意した。42°Cで3時間インキュベーション後にTCA沈殿及びPAGE分析によってRNA合成を測定した。表IIIに示すように、鋳型のすべての試験濃度でRNA合成量は鋳型非含有対照よりも多かった。実際の鋳型からRNA合成が総プラスミドDNAの1.8%に相当することに基づいて増幅度を計算した。

特定の初期鋳型濃度レベルからのRNA合成量（増幅度）は、合成オリゴヌクレオチド鋳型（表II）に比較して制限フラグメント（表III）が常に低い値を示した。この理由は、使用条件下において制限フラグメントの相補鎖との融合が生じるためであろう。

表 III

Msp I 一分解pGAGC TESTから
のRNA増幅

反応	鋳型本	合成RNA本*	増幅倍率本*
1	55.0ng [1ng]	3.86	3.7×10 ⁴
2		(4.06)	(4.1×10 ⁴)
3	5.5ng [100pg]	3.54	3.5×10 ⁴
4		(3.16)	(3.2×10 ⁴)
5	550.0pg [10pg]	2.29	2.3×10 ⁴
6		(2.79)	(2.8×10 ⁴)
7	55.0ng [1pg]	2.62	2.6×10 ⁴
8		(0.87)	(0.7×10 ⁴)
9	5.5pg [100fg]	1.37	1.4×10 ⁴
10		(2.26)	(2.3×10 ⁴)
11		1.25	
12		(0.08)	

* カギ括弧内の数値はR2, GAGC均等量を示す。

*本 括弧内の数値は1μgのMsp I一分解子ウシ胸腺DNAの存在下のRNA合成を示す。

3時間反応後に合成されたRNAをPAGEで分析した（第6図、反応と同じ番号のレーン1〜8、11及び12）。反応（レーン）1〜8には約100kbのRNAを示す主要バンドが存在していたが鋳型非含有反応（レーン11及び12）には該バンドが存在していなかった。レーン9のRNAは実施例3の手順で調製した標準RNAである。1μgのMsp I一分解子ウシ胸腺DNAを添加した合成RNA（レーン2、4及び6）または非添加合成RNA（レーン1、3及び5）との間に見掛けの定性的差異はなかった。

実施例7

鋳型としてのRNAフラグメントの使用

プラスミドpGAGC.TESTをXba Iで切断し、プロテイナーゼKで処理し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製した。T7 RNAポリメラーゼを用いて直線化したpGAGC.TESTプラスミドからR2, GAGCに相補的な配列のRNAを転写した。得られたRNAをDNase（Pro Mega BioTec）で

22

分解し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製した。実施例5の手順に従って精製RNAを増幅反応の鋳型として使用した。夫々の反応には55ng〜5.5pgの範囲の種々の量のRNAを添加した1つの反応には鋳型を添加しなかった。42°Cで3時間インキュベーション後、実施例5の手順に従って標識オリゴヌクレオチドプローブに対するハイブリダイゼーションによって特定RNAの合成を判定した。

実施例8

10 鋳型としてのリボソームRNAの使用

内部配列の増幅

大腸菌16SリボソームRNA（rRNA）の一部に相補的なRNA配列を増幅するために2つのプライマーを使用した。一方のプライマー-T7H181B3.PR2（AATCTTAATAGCACTACATACAGGAGTATTACCGCGCTCTCTG）は、7プロモーターのアンチセンス鎖と開始部位と16S rRNAに相補的な配列を含み、他方のプライマー-RI88.PR（AATACCTTTGCTCATTCACG）はプライマーとしてT7H181B3.PR2を使用し鋳型として16S rRNAを使用して合成されたDNAに相補的である。増幅の検出に使用できる第3の合成オリゴヌクレオチドRI85.PR（AGAGGACCGCGCTAAC）は増幅反応のRNA産物に相補的である。該RNA産物は出発rRNA鋳型に相補的である。

反応混合物（25μl）は、50mMのTris HCl（pH8.45）と6mMのMgCl₂と40mMのKClと10mMのDITと0.5mMのdNTPと1mMのdNTPと20単位のRNasinと10単位のT7 RNAポリメラーゼと10単位のRNA逆転写酵素と0.4単位のRNase Hと0.34μMのT7H181B3.PR2と0.34μMのRI88.PRとを含有する。

50ng〜500pgの範囲の種々の量のrRNAを反応物に添加する。1つの反応にはrRNAを添加しない。反応物を42°Cで3時間インキュベートし、インキュベーション開始の30分、60分、120分及び180分後にアリコート採取する。アリコートの反応を中止し、ナイロン膜に固定し、実施例5の手順で³²P dCTP 5'末端を標識したRI85.PRプローブにハイブリダイズする。

実施例9

鋳型としてのリボソームRNAの使用

5'末端配列の増幅

2つのプライマーを使用して大腸菌16S rRNAの一部に相補的なRNA配列を増幅する。一方のプライマー-RI81.PR（TTACTACCGCTCGCCG）は16S rRNAに相補的である。他方のプライマー-T7H181B5.PR（AATCTTAATAGCACTATATACGAGAAATTGAAGCATTTTATCAT）は、プライマーとしてRI81.2.PRを使用し鋳型として16S rRNAを使用して合成されたDNAの3'末端に相補的である。増幅の検出に使用できる第3の合成オリゴヌクレオチドRI81.PR（GTTCGACTTCATCTGTACGCTTACGCGTACGCGCTTCAATCTGACGC）は増幅RNA産物及び出発rRNA鋳型の双方に相補的である。（T7H181B3.PR2及びRI88.PRの代わりに）T7H181B5.PR及びRI81.2.PRをプライマーとして使用し、（RI85.PRの代わりに）RI

811, PRをオリゴヌクレオチドプローブとして使用する以外は実施例8と同様にしてRNAの増幅反応と合成RNAの検出を行なう。

上記では本発明を好適実施態様に基づいて詳細に説明したが、本発明の要旨及び特許請求の範囲に含まれる多様な変更が可能であることは当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

第1図は核酸増幅方法の全体図である。

第2図は増幅方法の試験に使用される合成オリゴヌクレ

オチドDNA配列を示し、第2A図は gag試験配列、第2B図は qag試験配列を示す。

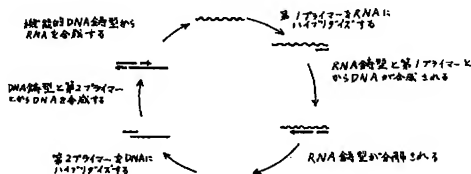
第3図は種々のプライマー濃度を使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

第4図は種々の鋳型温度を使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

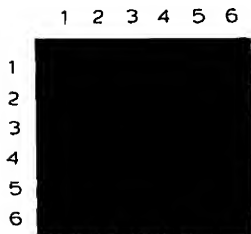
第5図は増幅反応に対するドットブロットハイブリダイゼーションのオートラジオグラムのX線写真を示す。

第6図は制限フラグメントを鋳型として使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

【第1図】



【第5図】



【第2図】

A

T7H1.GAG
 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAATAGGCCCTGCATGCACTGGATGACTCTATCCCAT

 GATTATGCTGAGTGATACTCCCTCTGTGTATCCGGGACGTACGTGACCTACATGAGATAGGGTA
 T74, PRO

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTTGATGGTCTCTTTTAACATTTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTCGAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAAT TGTAAACGTACCGACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)

124

B

H1.GAG
 GGGAGACAATAGGCCCTGCATGCACTGGATGACTCTATCCCAT

 CCCCTCTGTATCCGGGACGTACGTGACCTACATGAGATAGGGTA

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTTGATGGTCTCTTTTAACATTTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTCGAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAAT TGTAAACGTACCGACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)

124

(14)

特許2650159

【第3圖】

0 1 2 3 4



【第4圖】

1 2 3 4 5 6 7 8



(15)

特許2650159

【第6圖】

0 1 2 3 4 5 6 11 12

